



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Caracterização de plasmídeos de *Staphylococcus epidermidis* e
correlação com a resistência a compostos antimicrobianos
mediada por efluxo**

Frederico Duarte Holtreman

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL**

ABRIL DE 2018



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Caracterização de plasmídeos de *Staphylococcus epidermidis* e
correlação com a resistência a compostos antimicrobianos
mediada por efluxo**

Frederico Duarte Holtreman

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL**

Orientadora: Professora Doutora Isabel Couto

Co-orientadoras: Doutora Sofia Santos Costa

Professora Doutora Constança Pombo

Laboratório onde o trabalho experimental foi desenvolvido:

Unidade de Microbiologia Médica

Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

ABRIL DE 2018

Comunicações em congressos

Os resultados apresentados na presente Dissertação foram objecto de apresentação em co-autoria das seguintes comunicações em congressos, sob a forma de Poster:

Holtreman F, Costa SS, Rosa M, Viveiros M, Pomba C, Couto I. Influência do efluxo na resistência a antibióticos e susceptibilidade reduzida aos biocidas em *Staphylococcus epidermidis*. In Livro de abstracts do 4º Congresso Nacional de Medicina Tropical, IHMT, pp. 96. Lisboa, Portugal, 19-21 de Abril 2017

Holtreman F, Costa SS, Rosa M, Viveiros M, Pomba C, Couto I. Characterization of plasmid encoded efflux determinants from *Staphylococcus epidermidis*. In Livro de abstracts do Congresso Nacional de Microbiologia e Biotecnologia (Microbiotec17), pp. 353, P-273. Porto, Portugal, 7-9 de Dezembro 2017.

Costa SS, Rosa M, Rodrigues AC, Santos CM, Holtreman F, Viveiros M, Pomba C, Couto I. Characterization of antimicrobial resistance in *Staphylococcus epidermidis* colonizing veterinary staff and students. In Livro de abstracts do Congresso Nacional de Microbiologia e Biotecnologia (Microbiotec17), pp. 352, P-272. Porto, Portugal, 7-9 de Dezembro 2017.

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado a todos aqueles que participaram directa e indirectamente e que estiveram ao meu lado durante todo o período de realização deste trabalho. À minha orientadora, Professora Doutora Isabel Couto, pela disponibilidade e interesse demonstrado desde o primeiro momento. Pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência e empenho com que acompanhou a elaboração desta Dissertação. Pelas palavras de incentivo e conselhos que tornaram possíveis a sua elaboração mesmo quando esta parecia indicar o contrário. Agradeço também pelo grau de exigência que foi demonstrado ao longo deste trabalho ajudando-me a melhorar não só como pessoa mas acima de tudo como profissional. Por fim um muito obrigado pela oportunidade concedida de realizar este trabalho que representa um grande passo não só a nível pessoal mas também profissional.

À Doutora Sofia Santos Costa por todo o apoio, esforço, dedicação e interesse demonstrado desde o primeiro momento. Por todo o conhecimento transmitido, pela paciência e empenho com que acompanhou este trabalho. Agradeço também por todos os conselhos e palavras de incentivo que em muitas das situações foram fulcrais para a realização deste trabalho quando esta, em algumas situações parecia não ser possível. Agradeço ainda por todas as muitas perguntas colocadas no âmbito deste trabalho, perguntas estas cuja resposta não era dada de imediato, obrigando-me assim a pensar e a desenvolver o meu espírito crítico e raciocínio lógico.

À Professora Doutora Constança Pomba, pelo apoio e palavras de incentivo, e ainda pela disponibilização da colecção de *S. epidermidis* estudada na presente Dissertação.

Ao Professor Doutor Miguel Viveiros por todo o apoio e palavras de incentivo fornecidas em muitas ocasiões.

Ao Professor Doutor Celso Cunha pela disponibilidade e apoio no esclarecimento de dúvidas ao longo destes dois anos e meio de Mestrado.

À Doutora Diana Machado, por toda a ajuda prestada, quando esta era solicitada assim como na transmissão de conhecimentos.

À Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, pelas condições laboratoriais disponibilizadas, e a todos os colegas de laboratório pelo seu companheirismo, boa disposição e espírito de interajuda, estando dispostos a ensinar e ajudar sempre que necessário.

À Professora Doutora Maria Luísa Vieira e Mestre Teresa Carreira, do Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme do IHMT/UNL, pela disponibilização de equipamento necessário para algumas metodologias utilizadas neste trabalho.

Aos meus amigos, nomeadamente José Pedro Marinho, Ricardo Conde, Ricardo Vilela e Bruna Abrunhosa, por todo o apoio e motivação cruciais, tanto nas boas como principalmente nas más alturas, ajudando assim a encarar as adversidades encontradas ao longo deste trabalho com um sorriso e boa disposição. Por serem as pessoas incríveis que são, tendo estado sempre lá para o que fosse preciso e com simples palavras e atitudes, me darem força, quando esta era precisa.

Deixo também um agradecimento especial à colega e amiga Jéssica Antunes, por todo apoio prestado, palavras de motivação e consolo, por nunca ter deixado de acreditar em mim e por me dar força para continuar a lutar contra as adversidades com as quais me fui deparando. Agradeço pela pessoa incrível que é e que tive a sorte de conhecer.

Aos meus avós, João Holtreman e Hermínia Holtreman, por me terem acolhido em sua casa ao longo destes dois anos e meio de Mestrado, por todo o apoio, dedicação e força prestados e por nunca terem deixado de acreditar em mim.

Às minhas irmãs Mónica Holtreman e Beatriz Holtreman, pelo apoio e motivação que deram nesta fase tão importante da minha vida, por ouvirem e aturarem os desabafos do irmão respondendo sempre com uma palavra de força e consolo que foram fundamentais para ultrapassar algumas situações menos agradáveis.

Aos meus pais, Vitor Holtreman e Elisabete Holtreman, por todo o amor, carinho e apoio imprescindível que me deram não só nos últimos dois anos e meio, mas principalmente ao longo de toda a minha vida. Por serem os pais incríveis que são, por tudo o que sempre fizeram para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje. Por todas as palavras de apoio e conforto, por ouvirem os meus desabafos, por terem estado ao meu lado sempre que precisei e acima de tudo por nunca terem desistido de mim. Se não fossem eles, nunca teria conseguido chegar onde cheguei hoje. Por muitas palavras que eu consiga colocar aqui em gratidão, estas nunca vão ser suficientes para demonstrar o quão grato e orgulhoso estou por ter os pais que tenho. É com todo o orgulho que a eles dedico todo este trabalho realizado nestes dois anos e meio.

A todos deixo aqui um **MUITO OBRIGADO POR TUDO!**

Resumo

Staphylococcus epidermidis coloniza a pele e mucosas do Homem e de animais, sendo considerado um importante agente patogénico oportunista em clínica humana e veterinária. Embora já estejam descritos diversos determinantes plasmídicos de resistência a compostos antimicrobianos nesta bactéria, a caracterização de plasmídeos de coleções alargadas de *S. epidermidis* e o seu papel na disseminação destas resistências é ainda relativamente escassa. O objectivo desta Dissertação foi identificar e caracterizar perfis plasmídicos de isolados comensais de *S. epidermidis*, correlacionando-os com a presença de genes de resistência a compostos antimicrobianos, com ênfase naqueles que codificam para bombas de efluxo.

Para isso, estudou-se uma coleção de 112 *S. epidermidis* de colonização nasal em profissionais e estudantes de Medicina Veterinária. O DNA plasmídico foi isolado pelo método de lise alcalina e o perfil plasmídico determinado por digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (RFLP). A detecção de genes plasmídicos que codificam para bombas de efluxo associadas a resistência a antibióticos (*msrA*, *tetK*, *vga(A)* e *vga(C)*), a biocidas (*qacG*, *qacJ*) e a metais pesados (*cadA*, *cadD* e *arsB*) foi realizada por PCR e a presença destes correlacionada com o perfil de resistência estabelecido em trabalhos anteriores.

Este estudo permitiu demonstrar a presença de plasmídeos nos 112 isolados analisados, sendo a presença de plasmídeos de grandes dimensões (> 23 kb) predominante. A maioria dos isolados (66%) tinha dois ou mais plasmídeos. A análise por RFLP evidenciou uma grande heterogeneidade dos perfis plasmídicos. A pesquisa por PCR permitiu detectar o gene *msrA* em 35 de 57 isolados resistentes a macrólidos (61,4 %), o gene *tet(K)* em 25 dos 26 isolados resistentes à tetraciclina (96,2%), o gene *vga(A)* em 12 dos 19 isolados com resistência constitutiva à clindamicina (63,2%) e em 3 dos 19 com resistência indutível à clindamicina (15,8%) e o gene *vga(C)* em 15 dos 19 isolados com resistência constitutiva à clindamicina (78,9%) e em 15 dos 19 isolados com resistência indutível a este antibiótico (78,9%), naquela que deverá ser das primeiras descrições deste gene em isolados de origem humana. Para os metais pesados, nomeadamente para o cádmio, apenas se detectou o gene *cadA* em 3 dos 112 isolados (2,7%), não se tendo identificado a presença do gene *cadD*. Por fim, nenhum isolado apresentou os genes *qacJ* e *qacG*, associados à susceptibilidade reduzida a biocidas e corantes.

Este trabalho demonstra a elevada frequência de plasmídeos e de determinantes que conferem resistência por efluxo a antibióticos em estirpes de *S. epidermidis* de colonização nasal em humanos em contacto próximo com animais. O alargamento desta análise a outros genes de resistência, permitirá explorar a importância destes e dos plasmídeos que os transportam na disseminação de estirpes resistentes, com especial destaque para a ligação entre as vertentes humana e veterinária.

Abstract

Staphylococcus epidermidis colonizes the skin and mucous membranes of both Man and animals and it is considered to be an important opportunistic pathogen in human and animal medicine. Although several plasmid encoded determinants of antimicrobial resistance are known for this bacterium, the characterization of plasmids carried by large collections of *S. epidermidis* is scarce. The aim of this Dissertation was to identify and characterize plasmid profiles in *S. epidermidis*, correlating them with the presence of antimicrobial resistance genes, with emphasis on those coding for efflux pumps.

In this work we studied a collection of 112 *S. epidermidis* of nasal colonization in professionals and students of Veterinary Medicine. Plasmid DNA was isolated by the alkaline lysis method and the plasmid profile determined by restriction with enzyme *EcoRI* (RFLP). Detection of plasmid genes encoding efflux pumps associated with resistance to antibiotics (*msrA*, *tetK*, *vga(A)* and *vga(C)*), biocides (*qacG*, *qacJ*) and heavy metal (*cadA*, *cadD* and *arsB*) was performed by PCR. The presence of these determinants was correlated with the resistance phenotypes previously established.

This study demonstrated the presence of plasmids in the 112 isolates analyzed, with large plasmids (> 23 kb) predominating. The majority of the isolates (66%) carried two or more plasmids. RFLP analysis showed a great heterogeneity of the plasmid profiles. PCR screening detected the *msrA* gene in 35 out of 57 macrolide resistant isolates (61,4 %), the *tet(K)* in 25 of the 26 tetracycline resistant isolates (96.2%), the *vga(A)* in 12 of the 19 isolates with constitutive resistance to clindamycin (63,2%) and in 3 of 19 with inducible resistance to clindamycin (15.8%), whereas the *vga(C)* gene was identified in 15 of the 19 isolates with constitutive resistance (78.9%) and in 15 of the 19 isolates with inducible resistance to clindamycin (78.9%), in one of the first reports of *vga(C)* in humans. For heavy metals, particularly cadmium, the *cadA* gene was detected in 3 of 112 isolates (2.7%), while the *cadD* gene was not detected. Finally, no isolates showed the *qacJ* or *qacG* genes, associated with reduced susceptibility to biocides and dyes.

This work demonstrates the high frequency of plasmids and determinants conferring efflux mediated resistance to antibiotics in *S. epidermidis* strains of nasal colonization in humans in close contact with animals. The extension of this analysis to other plasmid encoded resistance genes will allow exploring their importance in the dissemination of resistant strains, with particular emphasis on the link between the human and veterinary perspectives.

Índice geral

Comunicações em congressos	ii
Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Índice geral	vii
Índice figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xii
Lista de unidades	xiii
1. Introdução	1
1.1 Género <i>Staphylococcus</i>	1
1.1.1 Características gerais	1
1.1.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
1.2 Compostos Antimicrobianos	3
1.2.1 Antibióticos	3
1.2.2 Biocidas e metais pesados	4
1.3 Mecanismos de resistência a compostos antimicrobianos	4
1.3.1 Resistência adquirida por transferência genética horizontal	5
1.3.2 Mecanismos de resistência a antibióticos	7
1.3.3 Mecanismos de resistência a biocidas e metais pesados	8
1.3.4 Sistemas de efluxo	9
1.4 Importância dos sistemas de efluxo na resistência a compostos antimicrobianos em <i>S. epidermidis</i>	10
1.4.1 Sistema de efluxo MsrA	10
1.4.2 Sistemas de efluxo da família Vga	11
1.4.3 Sistema de efluxo da família Tet(K)	12
1.4.4 Sistemas de efluxo que conferem resistência a compostos de amónio quaternário	12
1.4.5 Sistemas de efluxo que conferem resistência ao arsenato	13
1.4.6 Sistemas de efluxo que conferem resistência ao cádmio	14
1.5 Importância de plasmídeos na disseminação de resistência em <i>Staphylococcus</i>	15
1.6 Objectivos	16
2. Materiais e Métodos	17
2.1 Materiais	17
2.1.1 Estirpes bacterianas	17

2.1.2 Outro material biológico	17
2.1.3 Meios de cultura, compostos e soluções	18
2.2 Métodos	21
2.2.1 Manutenção e condições de crescimento de bactérias	21
2.2.2 Extração de DNA	21
2.2.2.1 Extração através do método de fervura	21
2.2.2.2 Extração de DNA por QIAamp DNA mini Kit	22
2.2.2.3 Extração através de lise alcalina	22
2.2.2.4 Extração de DNA Kit por QIAGEN Plasmid Midi Kit	23
2.2.3 Restrição de DNA plasmídico	24
2.2.4 Detecção de genes associados à resistência a compostos antimicrobianos	25
2.2.5 Electrotransformação	27
2.2.5.1 Preparação de células electrocompetentes	28
2.2.5.2 Processo de electrotransformação e selecção	28
3. Resultados	29
3.1 Análise de plasmídeos na colecção de <i>S. epidermidis</i> em estudo	29
3.1.1 Detecção de plasmídeos	29
3.1.2 Análise de perfis <i>EcoRI</i>	30
3.2 Detecção de genes de bombas de efluxo que conferem resistência a antibióticos	34
3.2.1 Resistência por efluxo a macrólidos	35
3.2.2 Resistência por efluxo a tetraciclinas	36
3.2.3 Resistência por efluxo a lincosamidas	36
3.3 Detecção de genes de bombas de efluxo que conferem resistência a biocidas	38
3.4 Detecção de genes de bombas de efluxo que conferem resistência a metais pesados	39
3.4.1 Detecção do gene <i>cadA</i>	42
3.4.2 Detecção do gene <i>cadD</i>	44
3.4.3 Detecção do gene <i>arsB</i>	46
3.5 Electrotransformação	48
4. Discussão e Conclusões gerais	49
5. Referências Bibliográficas	62
6. Anexos	77
Anexo I - Perfis plasmídicos e determinantes plasmídicos que codificam para bombas de efluxo	78
Anexo II - Alinhamento do fragmento interno do gene <i>cadA</i> e região de corte da enzima <i>XbaI</i>.	83

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de <i>Staphylococcus</i> com maior impacto na saúde humana e veterinária, baseado na produção de coagulase.	2
Figura 2. Processos naturais de transferência horizontal de DNA entre células bacterianas.	6
Figura 3. Mecanismos de resistência a compostos antimicrobianos.	8
Figura 4. Sistemas de efluxo presentes em bactérias Gram-positivas.	10
Figura 5. Distribuição dos plasmídeos detectados na colecção de <i>S. epidermidis</i> em estudo.	30
Figura 6. Padrões electroforéticos de plasmídeos de <i>S. epidermidis</i> antes e após a restrição com <i>EcoRI</i> .	31
Figura 7. Perfis plasmídicos e de restrição com a enzima <i>EcoRI</i> .	33
Figura 8. Electroforese em gel de agarose de produtos de amplificação do gene <i>msrA</i> .	35
Figura 9. Electroforese em gel de agarose de produtos de amplificação do gene <i>tet(K)</i> .	36
Figura 10. Electroforese em gel de agarose de produtos de amplificação do gene <i>vga(A)</i> .	37
Figura 11. Electroforese em gel de agarose de produtos de amplificação do gene <i>vga(C)</i> .	37
Figura 12. Gel de electroforese para validação do PCR para amplificação dos genes <i>qacG</i> e <i>qacJ</i> .	39
Figura 13. Sequências do gene <i>cadA</i> de três estirpes e respectivo local de ligação do “primerFW”.	42
Figura 14. Sequências do gene <i>cadA</i> de três estirpes diferentes e respectivo local de ligação do “primer RV”.	42
Figura 15. Electroforese em gel de agarose para detecção de produtos de amplificação do gene <i>cadA</i> .	43
Figura 16. Gel de electroforese da digestão com a enzima <i>XbaI</i> dos fragmentos internos do gene <i>cadA</i> detectados nos isolados FMV32, FMV76 e FMV87.	44
Figura 17. Sequências do gene <i>cadD</i> de três estirpes diferentes e respectivo local de ligação do “primer FW”.	44
Figura 18. Sequências do gene <i>cadD</i> de três estirpes diferentes e respectivo local de ligação do “primer RV”.	45

Figura 19. Sequências do gene <i>arsB</i> de cinco estirpes diferentes e respectivo local de ligação do “primer FW”.	46
Figura 20. Sequências do gene <i>arsB</i> de cinco estirpes diferentes e respectivo local de ligação do “primer RV”.	46
Figura 21. Gel de electroforese para testar a amplificação do fragmento interno do gene <i>arsB</i> com diferentes temperaturas de emparelhamento.	47
Figura 22. Padrões electroforéticos de plasmídeos dos isolados FMV53 e FMV52, antes e após restrição com <i>EcoRI</i> .	51
Figura 23. Diagrama de Venn representativo da distribuição dos genes plasmídicos pesquisados nos isolados de <i>S. epidermidis</i> em estudo.	56
Figura A1. Alinhamento do fragmento interno do gene <i>cadA</i> e região de corte da enzima <i>XbaI</i> .	84

Índice de Tabelas

Tabela 1. Estirpes controlo utilizadas no rastreio de genes plasmídicos associados à resistência a compostos antimicrobianos.	17
Tabela 2. Composição dos meios de cultura usados neste trabalho.	18
Tabela 3. Composição e modo de preparação das soluções utilizadas.	19
Tabela 4. Enzimas de restrição usadas neste trabalho.	19
Tabela 5. Outras enzimas usadas ao longo deste trabalho.	20
Tabela 6. Composição e modo de preparação de soluções de antibióticos, biocidas e metais pesados.	20
Tabela 7. Sequência nucleotídica dos “primers” utilizados neste trabalho e respectivo tamanho do amplicão.	26
Tabela 8. Programas para amplificação dos vários fragmentos internos dos genes alvo estudados.	27
Tabela 9. Isolados com um plasmídeo e respectivo tamanho.	32
Tabela 10. Isolados com dois plasmídeos e respectivos tamanhos.	32
Tabela 11. Análise <i>in silico</i> de genes de <i>S. epidermidis</i> homólogos aos genes <i>cadA</i> , <i>cadD</i> e <i>arsB</i> presentes em plasmídeos de <i>S. aureus</i> .	41
Tabela A1. Perfis plasmídicos e determinantes plasmídicos que codificam para bombas de efluxo presentes nos isolados de <i>S. epidermidis</i> de colonização humana.	79

Lista de abreviaturas

ABC – “ATP-binding cassette”

ATP - Adenosina trifosfato, de “Adenosine triphosphate”

CMI – Concentração mínima inibitória

CoNS – Estafilococos não produtores de coagulase, de “coagulase-negative staphylococci”

DNA – Ácido desoxirribonucleico, de “desoxyribonucleic acid”

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos, de “desoxyribonucleotide”

DO – Densidade óptica

ERY – Eritromicina

EtBr – Brometo de etídeo

MATE – “Multidrug and Toxic Compound Extrusion”

MDR – Multirresistência, de “multidrug resistance”

MFS – “Major Facilitator Superfamily”

MRSE – *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina, de “methicillin-resistant *S. epidermidis*”

ORF – Open reading frame

PCR – Reacção de polimerase em cadeia, de “polymerase chain reaction”

QAC – Compostos de amónio quaternário, de “quaternary ammonium compounds”

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

RND – “Resistance-Nodulation-Cell Division”

TET – Tetraciclina

TSA – “Tryptone Soya Agar”

TSB – “Tryptone Soya Broth”

UPGMA – Unweighted pair group method with arithmetic mean

Lista de Unidades

pb – pares de bases, kb – “Kilo base”

μL – microlitro, mL – mililitro, L – litro

μg – micrograma, mg – miligrama, g – gramas

seg – segundos, min – minutos

μm – micrómetro

mM – milimolar; μM – micromolar

pmol - picomole

rpm – rotações por minuto

U – unidades

μF – capacitância “Farad”

kV – “Kilo Volt”

Ω – ohm

1. Introdução

1.1. Género *Staphylococcus*

1.1.1. Características gerais

As bactérias pertencentes ao género *Staphylococcus* caracterizam-se por serem cocos Gram-positivo, capsulados e imóveis, com tamanho entre 0,5 e 1,5 µm. Os cocos organizam-se em pares, tétradas ou aglomerados em forma de cacho, podendo ainda ser observados isoladamente [7]. Os estafilococos caracterizam-se por serem bactérias anaeróbias facultativas e produtoras de catalase [7]. Dentro do género é possível distinguir dois grupos, os estafilococos produtores de coagulase, onde se integra a espécie *Staphylococcus aureus*, uma das mais estudadas; e os não produtores de coagulase (CoNS, de “coagulase negative staphylococci”) onde estão inseridas espécies como *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* (Figura 1) [6, 10].

No Homem, estas são bactérias comensais, colonizadoras da pele e mucosas, que apresentam na maior parte dos casos uma relação benigna com o hospedeiro. A espécie mais frequentemente encontrada no Homem é *S. epidermidis*, embora outras espécies como *S. aureus* e *Staphylococcus hominis* ocorram com elevada frequência. A espécie *S. epidermidis* é considerada um agente patogénico oportunista importante, sendo um dos principais causadores de infeções de âmbito hospitalar [10].

Nos animais, as espécies de estafilococos com maior impacto clínico e mais frequentes são, no caso dos CoNS, *S. epidermidis*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus felis*, *Staphylococcus caprae*, entre outros; e no caso dos estafilococos produtores de coagulase, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus hyicus* e *S. aureus* (Figura 1) [10, 26].

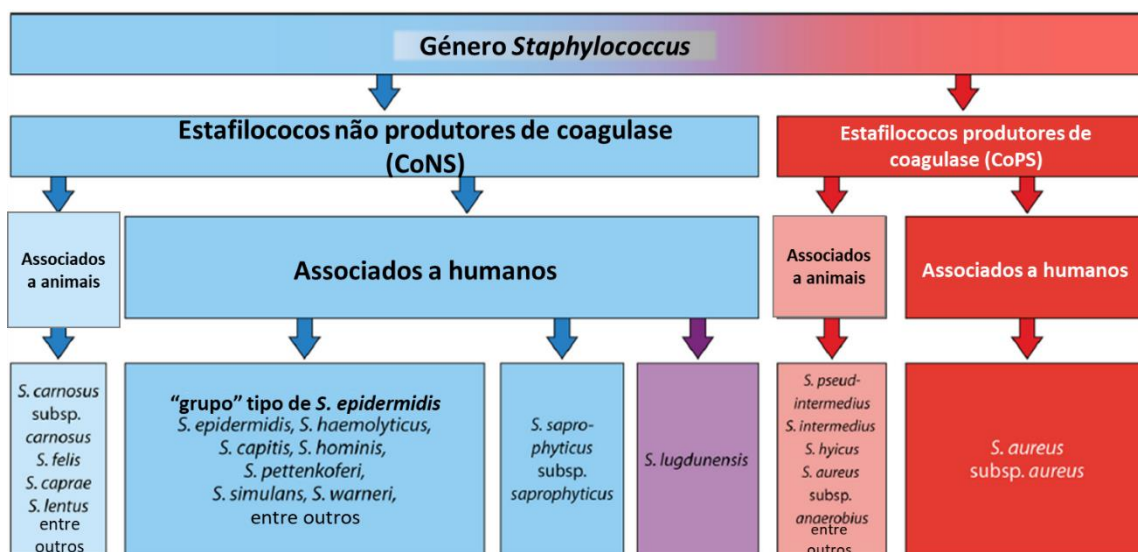


Figura 1. Esquema das espécies de *Staphylococcus* com maior impacto na saúde humana e veterinária, baseado na produção de coagulase [adaptado de 10].

CoNS- estafilococos não produtores de coagulase; CoPS- estafilococos produtores de coagulase.

1.1.2 *Staphylococcus epidermidis*

A espécie *S. epidermidis* é conhecida por colonizar a pele e mucosas tanto do ser humano como de animais. Encontra-se frequentemente em zonas húmidas como as axilas, a área inguinal e perineal, as narinas anteriores, a conjuntiva, entre outras [67, 101]. Esta espécie está equipada com genes essenciais que fornecem protecção contra as diversas condições adversas do seu nicho ecológico, desempenhando ainda um papel importante no balanço do microbioma epitelial, por exemplo, na protecção contra a colonização por outras espécies potencialmente patogénicas, como *S. aureus* [118].

No Homem, *S. epidermidis* é um dos principais agentes causadores de infecções nosocomiais oportunistas [38, 48, 87, 100]. Estas infecções são frequentemente associadas a estados de imunossupressão do hospedeiro e/ou à contaminação e colonização de equipamentos médicos, como cateteres, podendo originar bacteriémias, endocardites, abscessos, infecções do trato urinário, infecções oculares entre outras [100, 118].

Numa perspectiva veterinária, *S. epidermidis* é um dos principais agentes etiológicos de infecções intramamárias em ruminantes, estando também implicado em infecções em animais domésticos e de produção [6, 26, 97].

S. epidermidis apresenta uma grande diversidade de genes de resistência a compostos antimicrobianos, verificando-se que um elevado número de estirpes que circulam em ambiente hospitalar são resistentes aos beta-lactâmicos (MRSE, de “methicillin-resistant *S. epidermidis*”), apresentando ainda elevada frequência de resistência a outras classes de antibióticos [6, 101]. Estes genes de resistência podem encontrar-se não só no cromossoma mas também em elementos genéticos móveis como plasmídeos. Outro factor que contribui para a resiliência de *S. epidermidis* aos esquemas terapêuticos é a sua capacidade de formação de biofilmes, aglomerados multicelulares que contribuem para um aumento da resistência a compostos antimicrobianos e escape ao sistema imunitário do hospedeiro [30].

Nos últimos anos tem-se discutido o potencial de transmissão zoonótica de *S. epidermidis* (e outros estafilococos), existindo já estudos que relatam a partilha de clones entre humanos e animais [6, 59, 101, 141]. Por estes motivos torna-se cada vez mais necessária a compreensão da epidemiologia e dos fenótipos/genótipos associados à resistência a compostos antimicrobianos em *S. epidermidis*, quer em contexto de infecção, quer em contexto comensal.

1.2 Compostos Antimicrobianos

1.2.1 Antibióticos

Os antibióticos são definidos como substâncias químicas de origem natural (produzidas por microorganismos) ou de origem sintética (como por exemplo, as fluoroquinolonas), que possuem toxicidade selectiva, ou seja, capacidade de provocar a morte celular ou inibir o crescimento de microorganismos de forma específica sem prejudicar o hospedeiro [23].

Desde a introdução dos antibióticos na prática clínica até aos dias de hoje, foram descobertas ou desenvolvidas diversas classes de antibióticos, podendo estes ter uma acção bacterioestática, quando inibem o crescimento celular, facilitando a eliminação posterior das bactérias pelo sistema imunitário do hospedeiro; ou bactericida, quando provocam a morte celular [23].

1.2.2 Biocidas e metais pesados

Os biocidas são utilizados amplamente em ambiente hospitalar na desinfecção de superfícies e equipamentos médicos [45, 63, 84, 119, 149]. São também usados como antisépticos, por exemplo, na desinfecção de mãos, mucosas e pele [84]. Embora estes compostos sejam capazes de eliminar bactérias, ao contrário dos antibióticos não possuem mecanismos de acção específicos, podendo actuar simultaneamente em vários alvos celulares [47], exceptuando-se o triclosan, quando utilizado a concentrações mais baixas [49].

Os biocidas são classificados com base no seu mecanismo de acção, dividindo-se em oxidantes (halógenos e peróxidos), electrófilos (formaldeído), líticos (clorhexidina e compostos de amónio quaternário) e protonóforos (alguns ácidos fracos) [47, 99, 108, 109]. Os biocidas possuem, frequentemente, na sua constituição metais pesados [56], os quais desempenham também um papel fundamental em desinfecção, estando presentes em materiais como gazes e ligaduras, utilizados no tratamento e prevenção de infecções [75, 135]. Os metais pesados são também utilizados na agricultura, pecuária [52], e na cosmética [56].

Devido à multiplicidade de alvos dos biocidas, o aparecimento de resistência a estes compostos raramente ocorre por modificação do alvo celular, estando mais frequentemente associado à redução da concentração do biocida dentro da célula, quer por diminuição da permeabilidade celular, quer por efluxo [123]. Na última década começaram a surgir estirpes com susceptibilidade reduzida aos biocidas [45, 63, 119]. Para além disso, alguns estudos têm sugerido uma possível acção selectiva dos biocidas na manutenção e/ou disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos [45, 79, 63, 84, 99, 119, 122].

1.3 Mecanismos de resistência a compostos antimicrobianos

A resistência aos antibióticos é hoje em dia um dos maiores problemas de saúde pública global [144, 150]. Actualmente é conhecido pelo menos um tipo de mecanismo de resistência bacteriana para cada classe de antibióticos, e diversas espécies bacterianas apresentam fenótipos de multirresistência (MDR, de “multidrug resistance”), responsáveis por infecções de difícil tratamento. Para além disso, a descrição de estirpes

com susceptibilidade reduzida a biocidas e a sua possível acção como força selectiva de resistência a antibióticos é alvo de crescente preocupação [123].

A resistência a compostos antimicrobianos pode ser uma característica intrínseca de uma dada espécie bacteriana. Por exemplo, algumas bactérias Gram-negativas, devido à composição da membrana celular externa, são menos permeáveis à entrada de alguns compostos, tornando-se assim menos susceptíveis à acção tóxica destes [84, 99]. Por outro lado, a resistência pode ocorrer por aquisição de DNA exógeno (por exemplo, aquisição do elemento *SCCmec*) ou por ocorrência de mutações em genes alvo [84, 99], sendo assim designada por resistência adquirida.

1.3.1 Resistência adquirida por transferência genética horizontal

O conteúdo genético de uma bactéria é representado por dois tipos de estrutura essenciais: o cromossoma, que alberga genes essenciais, e elementos genéticos extra-cromossomais como os plasmídeos. Qualquer uma destas estruturas pode ainda conter outras estruturas genéticas, como transposões ou integrões, conhecidos como elementos genéticos móveis (EGM's) e que carregam consigo genes acessórios permitindo assim que a célula se consiga adaptar a novas condições ambientais [18, 25]. A transferência horizontal de DNA exógeno, como plasmídeos ou mesmo DNA livre, pode ocorrer através de três processos naturais de transferência: conjugação, transformação e transdução (Figura 2) [1, 42, 80, 139].

A existência de elementos genéticos associados à resistência bacteriana tem-se tornado um problema cada vez mais preocupante, devido à disseminação de genes por transferência horizontal entre bactérias da mesma espécie, espécies diferentes e até mesmo a aquisição destes a partir do meio ambiente [1, 3, 42, 80]. Em *S. epidermidis*, assim como em *S. aureus*, existem já vários estudos que relatam a transferência de múltiplos genes de resistência entre estas duas espécies através da disseminação de plasmídeos, evidenciando assim o papel que estes elementos genéticos desempenham, quer como reservatórios de genes de resistência, quer na sua disseminação [17, 80, 127].

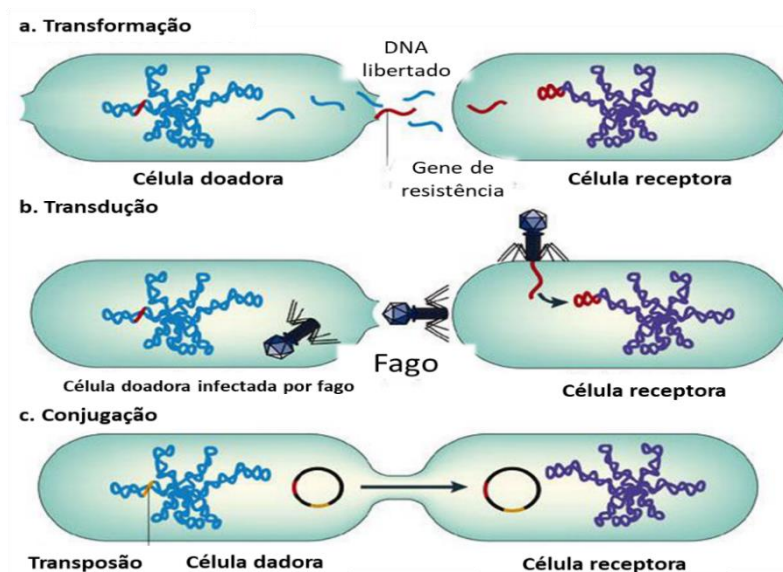


Figura 2. Processos naturais de transferência horizontal de DNA entre células bacterianas [adaptado de 42].

- **Plasmídeos**

Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares extra-cromossômicas capazes de replicação independente do cromossoma através da sua origem de replicação, assim como de sequências específicas e proteínas regulatórias [11, 41, 73, 131]. Para além de genes envolvidos na sua replicação, os plasmídeos podem transportar genes que conferem à célula hospedeira vantagens selectivas, nomeadamente associados à virulência ou à resistência a compostos antimicrobianos [19]. Uma das características mais importantes dos plasmídeos é a capacidade de adquirirem outros elementos genéticos móveis, como integrões e transposões, os quais podem conter genes adicionais de resistência [73, 131]. Para além dos genes de resistência, os plasmídeos podem transportar genes associados a patogenicidade, como por exemplo genes de virulência, ou ainda enzimas que podem actuar a nível da biodegradação de resíduos orgânicos e inorgânicos [11, 41, 60].

Em termos de diversidade, os plasmídeos podem variar bastante no seu tamanho, número e tipo de genes que transportam e ainda no seu mecanismo de replicação [11, 80]. Os plasmídeos de estafilococos foram descritos pela primeira vez em meados da década de 60 [90, 131], tendo começado a desenvolver-se múltiplos estudos para a classificação destes elementos genéticos móveis. A primeira classificação, ainda usada, distingue três classes:

- Classe I: plasmídeos de pequenas dimensões (1 a 5 kb), presentes em elevado número de cópias (10-50 por célula), que apresentam, frequentemente, apenas um determinante de resistência [39, 60, 73, 90]. A nível da maquinaria de replicação, esta ocorre por um mecanismo de círculo rolante, através de um intermediário de cadeia simples [39, 60, 73, 77, 90]. Os plasmídeos desta classe subdividem-se em quatro famílias com base nas semelhanças das sequências de genes de replicação e na organização funcional [90].
- Classe II: engloba plasmídeos de dimensões intermédias (15 a 40 kb). Estes caracterizam-se por ser plasmídeos de baixo número de cópias (4-6 por célula), replicando-se pelo mecanismo theta. Plasmídeos pertencentes a esta classe transportam normalmente vários determinantes de resistência a diferentes compostos antimicrobianos [73, 77, 80, 90].
- Classe III: engloba plasmídeos de maiores dimensões com tamanhos compreendidos entre 40 e 60 kb. Estes podem transportar múltiplos genes de resistência, possuindo também um mecanismo de replicação semelhante. Podem também mediar a sua própria transferência para outras células bacterianas por conjugação (presença de genes *tra* e *trs*), podendo ainda efectuar a mobilização de plasmídeos de menores dimensões [39, 60, 73, 90].

1.3.2. Mecanismos de Resistência a antibióticos

A resistência aos antibióticos é um dos temas mais debatido e estudado actualmente. Embora a resistência bacteriana aos antibióticos já ocorresse antes da implementação destes na prática clínica [36], o uso extensivo de antibióticos exerceu uma pressão selectiva nas bactérias levando à disseminação e à emergência de mecanismos de resistência [35, 53, 81, 102].

Os mecanismos de resistência aos antibióticos mais frequentes incluem a degradação ou modificação enzimática do antibiótico, a modificação do alvo bacteriano e a redução da concentração intracelular do antibiótico, por redução da permeabilidade celular ou por efluxo do antibiótico (Figura 3) [106]. O efluxo é um mecanismo com particular interesse uma vez que algumas das bombas de efluxo têm a capacidade de expulsar da célula

bacteriana várias classes de antibióticos e biocidas, podendo contribuir para a emergência de fenótipos MDR [2, 106].

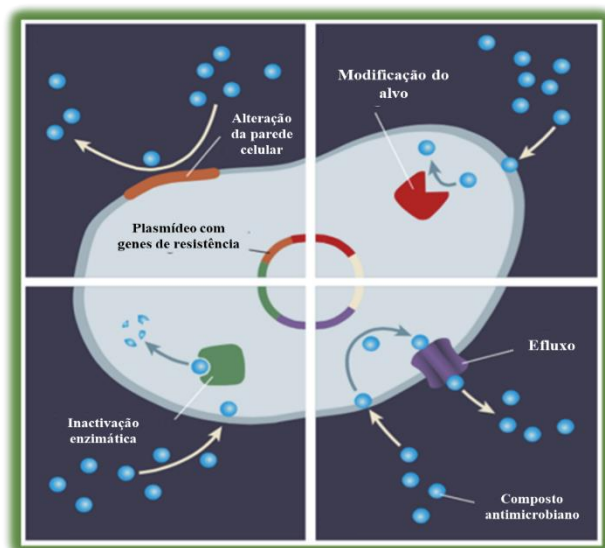


Figura 3. Esquema representativo dos principais mecanismos de resistência a compostos antimicrobianos [adaptado de 34].

1.3.3 Mecanismos de Resistência a biocidas e metais pesados

Tal como para os antibióticos, o uso excessivo de biocidas tem originado preocupação quanto à possível emergência de estirpes com susceptibilidade reduzida a estes, e também, ao potencial papel destes como pressão selectiva para a emergência de estirpes resistentes aos antibióticos [45, 79, 84, 99, 122, 123]. Uma vez que os biocidas actuam em vários alvos celulares em simultâneo, a resistência a estes compostos surge essencialmente, não por mutação, mas através da redução da concentração intracelular destes, conferida por diminuição da permeabilidade da parede celular e/ou pela acção de bombas de efluxo [20, 109, 122, 123]. Como excepção surge a resistência ao triclosan, devido à sua acção específica a baixas concentrações, que pode surgir devido a mutações no gene *fabI* [49] ou à aquisição de uma cópia adicional deste gene (*sh-fabI*), presente em elementos genéticos móveis [24].

À semelhança dos antibióticos, a resistência bacteriana aos metais pesados tem por base os seguintes mecanismos: modificação do composto; modificação da via metabólica;

degradação ou modificação enzimática e a redução da concentração intracelular através da diminuição da permeabilidade celular e/ou efluxo [75].

1.3.4 Sistemas de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas membranares que efectuam o transporte activo de diversos compostos através da membrana celular, geralmente por um mecanismo de antiporte [108]. As bombas de efluxo podem transportar uma classe específica de compostos antimicrobianos, sendo designadas por bombas de efluxo específicas, ou várias classes de antibióticos e/ou outros compostos antimicrobianos, sendo designadas por bombas de efluxo MDR [72, 108]. A classificação das bombas de efluxo MDR é feita com base na sua fonte energética, sendo divididas em transportadores activos primários, quando utilizam a hidrólise do ATP como fonte de energia; e transportadores activos secundários, quando utilizam como fonte de energia o gradiente membranar protónico ou de Na^+ [105].

Estas bombas de fluxo são também classificadas de acordo com a sua filogenia [111]. Entre os transportadores activos primários encontra-se descrita a família “ATP- Binding Cassette” (ABC) [68]. Relativamente aos transportadores activos secundários, estes incluem as seguintes famílias: Superfamília “Major Facilitator” (MFS) [103]; Superfamília “Resistance-Nodulation-cell Division” (RND) [88]; Família “Small Multidrug Resistance” (SMR) [8, 9] e ainda a família “Multidrug And Toxic compound Extrusion” (MATE), que utilizam o gradiente membranar de Na^+ e/ou H^+ [70]. As diferentes famílias de sistemas de efluxo presentes em bactérias Gram-positivas, ABC, SMR, MFS e MATE, encontram-se ilustradas na Figura 4. A presença de bombas de efluxo da família RND é mais frequente em bactérias Gram- negativas [106, 108]. De modo geral, os sistemas de efluxo MDR encontram-se codificados no cromossoma bacteriano, enquanto os sistemas de efluxo específicos se encontram codificados em elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões) [106, 108].

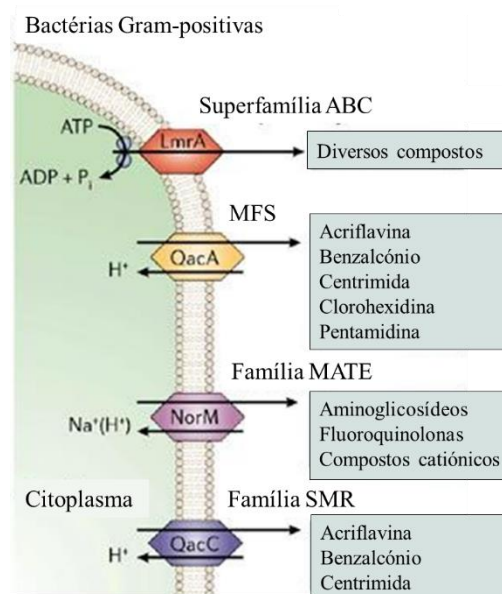


Figura 4. Sistemas de efluxo presentes em bactérias Gram-positivas [adaptado de 107].

1.4 Importância dos sistemas de efluxo na resistência a compostos antimicrobianos em *S. epidermidis*

Em *S. epidermidis* e outros estafilococos estão já identificados alguns sistemas de efluxo plasmídicos que conferem resistência a diversas classes de compostos antimicrobianos, tanto antibióticos como biocidas e metais pesados. Estes incluem as bombas MsrA (resistência a macrólidos e estreptograminas B) [114]; Tet(K) e Tet(L) (resistência a tetraciclina) [128, 130]; Vga(A) e as suas variantes, Vga(C) (resistência a lincosamidas, estreptograminas A e pleuromutilinas) [21], entre outros. Entre os sistemas envolvidos na resistência aos biocidas encontram-se as bombas de efluxo QacA/B [16], Smr [50], QacG [54], QacH [55], QacJ [13]. Para a resistência aos metais pesados, estão descritos alguns sistemas de efluxo, nomeadamente, CadA [93] e CadD [33] na resistência ao cádmio e ArsB na resistência ao arsenato [15], entre outros [56].

1.4.1. Sistema de efluxo Msr(A)

O gene *msrA* codifica a bomba de efluxo MsrA, constituída por 488 aminoácidos e pertencente à superfamília ABC [114]. Em estafilococos, esta bomba confere resistência indutível a estreptograminas do tipo B e à eritromicina [114].

1.4.2 Sistemas de efluxo da família Vga

As proteínas Vga, pertencentes à superfamília ABC, são codificadas por genes que se encontram normalmente em plasmídeos ou transposições em *Staphylococcus spp.* [21]. Estas bombas de efluxo conferem resistência a diversas classes de antibióticos, nomeadamente, lincosamidas, estreptograminas A e pleuromutilinas [78]. Em *Staphylococcus spp.* são conhecidos quatro genes (*vga(A)*, *vga(B)*, *vga(C)*, *vga(E)*) e duas variantes de *vga(A)*, *vga(A)_v* e *vga(A)_{LC}* [21, 78].

- **Vga(A) e os seus variantes (Vga(A)_v e Vga(A)_{LC})**

O gene *vga(A)* codifica para uma proteína constituída por 522 aminoácidos, Vga(A), que confere níveis elevados de resistência às estreptograminas A e resistência de baixo nível à lincomicina em *S. aureus* e *S. epidermidis* [21].

O gene *vga(A)_v*, possui 83,2% de identidade com *vga(A)*, codificando também para uma proteína de ligação ao ATP, Vga(A)_v, que confere resistência a estreptograminas A e resistência de baixo nível à lincomicina [21]. No entanto, ao contrário de *vga(A)*, a variante *vga(A)_v* pode estar presente em múltiplas cópias no genoma, tanto a nível do cromossoma como de plasmídeo, disseminando-se principalmente por transposições [51].

A variante *vga(A)_{LC}* foi descrita pela primeira vez em estirpes de *S. haemolyticus* resistentes a lincosamidas e estreptograminas A [92], tendo também já sido descrita em estafilococos isolados de animais de estimação [37], e ainda em dois isolados clínicos de *S. aureus* [112]. Vga(A)_{LC} é uma proteína que difere do gene *vga(A)* em 10 substituições nucleótídicas, sete das quais conduzindo a alterações de aminoácidos, que originam um fenótipo de resistência de alto nível à lincomicina e estreptograminas A [92].

Novotna *et al* verificaram que ao transferirem este gene para uma estirpe susceptível de *S. aureus* (RN4220), esta adquire resistência às lincosamidas e estreptograminas A, mas não com valores tão altos como em *S. haemolyticus* sugerindo assim que os níveis de resistência que este tipo de transportador ABC confere variam consoante a espécie [92]. Num outro estudo, Qin *et al*, detectaram a presença de *vga(A)_{LC}* em plasmídeos de dois isolados clínicos de *S. aureus* resistentes à clindamicina. A transformação da estirpe susceptível *S. aureus* RN4220 com esses plasmídeos conferiu à estirpe transformada um

fenótipo de resistência à clindamicina, levando os autores a afirmar não só a possibilidade de transferência horizontal destes plasmídeos mas também que esta se deve, possivelmente à pressão do antibiótico [112].

- **Sistema de efluxo Vga(C)**

O gene *vga(C)* foi descrito pela primeira vez no plasmídeo pKKS825 de uma estirpe de *S. aureus* resistente à meticilina [65]. Estudos posteriores indicam que este se encontra predominantemente em amostras de animais, não havendo até à data, relatos da sua presença em amostras humanas [148]. Este gene codifica para uma proteína com 523 aminoácidos, Vga(C), que apresenta entre 62,3% a 65,5% de identidade com a proteína Vga(A) e variantes e apenas 39,2% com a proteína Vga(B) [65]. No entanto o fenótipo de resistência que confere é semelhante à das outras proteínas Vga [65].

1.4.3 Sistema de efluxo Tet(K)

Os genes *tet(K)* e *tet(L)* codificam para os transportadores MFS, Tet(K) e Tet(L), constituídos por 459 e 458 aminoácidos, respectivamente [66, 126]. Ambos conferem resistência às tetraciclina, com excepção da minociclina [22]. O gene *tet(K)* foi detectado pela primeira vez no plasmídeo pT181 de *S. aureus* [66], enquanto *tet(L)* foi detectado pela primeira vez nas espécies *S. hyicus* e em espécies CoNS como *S. epidermidis*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri* e *Staphylococcus xylosus* de origem animal [126, 129]. Estes genes encontram-se frequentemente em plasmídeos de pequenas dimensões (<3 kb) [131]. Por outro lado, o gene *tet(L)* ocorre com menor frequência [130].

1.4.4 Sistemas de efluxo que conferem resistência a compostos de amónio quaternário

Em estafilococos estão já descritos alguns genes que conferem resistência por efluxo a biocidas entre as quais as bombas NorA, NorB, NorC, localizadas no cromossoma bacteriano e responsáveis por conferir resistência principalmente a fluoroquinolonas hidrofílicas e hidrofóbicas, a alguns corantes como o brometo de etídio e ainda a

compostos de amônio quaternário (QAC) como o cloreto de benzalcônio (BAC) e a ceftriaxona [29].

Em plasmídeos, encontram-se também já descritas várias bombas de efluxo associadas à resistência a estes compostos, entre elas as bombas Qac, codificadas em plasmídeos [13, 54, 55, 58]. Estas têm como função o efluxo de QAC, diamidinas, bisbiguanidinas e corantes [29]. Dentro dos sistemas de efluxo que conferem resistência a estes compostos, as proteínas QacA/B, pertencentes à família MFS, são aquelas que se encontram melhor caracterizadas em estafilococos, conferindo níveis de resistência mais elevados a biocidas (QACs) comparativamente aos outros sistemas de efluxo Qac pertencentes à família SMR, nomeadamente QacG, QacH e QacJ [13, 54, 55, 104].

O gene que codifica a bomba de efluxo QacH (*qacH*) foi identificado pela primeira vez no plasmídeo p2H6 de *S. saprophyticus*, codificando para uma proteína constituída por 107 aminoácidos que confere resistência aos corantes brometo de etídeo e proflavina [55]. Este sistema de efluxo possui ainda um elevado grau de semelhança com bombas pertencentes à família de sistemas de efluxo SMR, possuindo 78% de homologia com a bomba de efluxo Smr que confere igualmente resistência a compostos de amônio quaternário [55]. A bomba QacG foi identificada pelo mesmo grupo, no plasmídeo pST94 em estafilococos isolados na indústria alimentar, possuindo 107 aminoácidos e conferindo resistência ao cloreto de benzalcônio e ao brometo de etídio [54]. Este sistema de efluxo apresenta 68,2% de homologia com a bomba Smr [54]. Relativamente à bomba QacJ, o gene que a codifica foi identificado no plasmídeo pNVH01 em estirpes de *S. aureus*, *S. simulans* e *S. intermedius*. Esta proteína é também constituída por 107 aminoácidos e confere resistência ao cloreto de benzalcônio (BAC) e ao brometo de cetiltrimetilamônio, apresentando 72,5% de homologia com a proteína Smr e 82,6% de homologia com QacG [13].

1.4.5 Sistemas de efluxo que conferem resistência ao arsenato

A resistência a este composto foi descrita pela primeira vez em Gram-positivas tendo sido também descrita em Gram-negativas pouco tempo depois [76].

O operão responsável pela resistência a este metal, *arsRBC*, pode diferir no número de genes que possui, sendo na sua estrutura mais simples constituído pelo gene *arsB*, que codifica a proteína transportadora membranar (bomba de efluxo ArsB), pelo gene *arsR*, que codifica um repressor da transcrição, e por último, pelo gene *arsC*, codificando uma redutase [56, 113]. O operão *arsRBC* encontra-se principalmente em bactérias Gram-positivas, nomeadamente no plasmídeo pI258 de *S. aureus* [56, 113]. No caso das bactérias Gram-negativas, este operão possui adicionalmente o gene *arsD* que codifica para uma proteína que auxilia a actividade de efluxo via ArsAB [56, 113]. Possui ainda o gene *arsA*, que codifica uma ATPase que se liga como dímero à bomba de efluxo ArsB, tornando o sistema de efluxo mais eficiente [56, 113]. Os operões *ars* conferem ainda resistência a compostos como o arsenito (As (III)) e ainda à antimonite (Sb (III)) [56].

1.4.6 Sistemas de efluxo que conferem resistência ao cádmio

No que diz respeito à resistência por efluxo ao cádmio, estão descritos diversos operões associados à resistência a este metal [93]. Um dos sistemas melhor caracterizados em bactérias Gram-positivas é o operão *cadCA*, identificado pela primeira vez no plasmídeo pI258 de *S. aureus* [93]. Este é constituído pelo gene *cadA*, que codifica para a bomba de efluxo CadA, constituída por 727 aminoácidos [93], e pelo gene *cadC*, que codifica um repressor de *cadA*. O operão *cadBX*, identificado no plasmídeo pII147 de *S. aureus* [33, 93], engloba o gene *cadB*, responsável por codificar uma proteína que acumula e liga iões Cd^{2+} à membrana celular [33], e o gene *cadX* que codifica uma proteína com 40% de homologia a CadC, actuando como activador em vez de repressor. Por fim, existe ainda um outro operão, detectado no plasmídeo pWR001 de *S. aureus*, designado por *cadDX** [33]. Este operão é constituído pelo gene *cadX**, que codifica a proteína CadX*, mais pequena e com 86% de homologia em relação à produzida pelo operão *cadBX* (CadX). [33]. Possui ainda o gene *cadD*, que codifica também para uma proteína de membrana (CadD), que apresenta 84% de homologia com a proteína CadB. Apesar da semelhança entre os dois operões, os níveis de resistência ao cádmio conferidos pelo sistema CadDX* são relativamente mais baixos [33].

1.5 Importância de plasmídeos na disseminação de resistência em *Staphylococcus*

Em estafilococos e na maioria das espécies bacterianas, a resistência a compostos antimicrobianos comumente usados na medicina humana ou veterinária, é mediada por genes que estão associados, em grande parte, a elementos genéticos móveis (EGMs), como os plasmídeos [115, 152]. O importante papel epidemiológico dos plasmídeos é ainda evidenciado por estudos que relatam a sua transmissão entre estafilococos de diversas origens (humana, animal ou ambiental) ou com bactérias de géneros diferentes, como por exemplo, *Streptococcus* e *Enterococcus* [115.152].

Alguns plasmídeos podem transportar consigo diversos tipos de determinantes, como por exemplo genes *mob* para mobilização ou genes do complexo *tra* para conjugação, característicos da maquinaria de replicação dos mesmos e que lhes permitem ser transportados para outras células sem recorrer à maquinaria celular [74, 90]. No que diz respeito aos genes de resistência que estes plasmídeos podem transportar consigo, em estafilococos, plasmídeos de pequenas dimensões, de uma maneira geral apenas carregam consigo unicamente um gene de resistência, no caso dos plasmídeos de maiores dimensões, estes podem carregar múltiplos genes de resistência geralmente acoplados a genes que conferem resistência a metais pesados e desinfetantes/biocidas [131].

As bactérias do género *Staphylococcus*, transportam frequentemente um ou mais plasmídeos por célula, plasmídeos estes que, como referido anteriormente, podem apresentar tamanhos e conteúdos genéticos variados [11, 41, 60, 80, 131]. Dentro das células, os plasmídeos podem apresentar-se de 4 conformações distintas, sobre a forma de DNA circular livre, podem linearizar, super-enrolar ou ainda integrarem-se no cromossoma bacteriano [11, 41, 60, 80, 131]. Na generalidade apresentam tamanhos compreendidos entre 2 kb e 100 kb [131].

1.6 Objectivos

Esta Dissertação teve como principal objectivo identificar e caracterizar os plasmídeos de *S. epidermidis* comensais em humanos em contacto próximo com animais, em particular em termos de determinantes genéticos de bombas de efluxo envolvidas na resistência a diferentes compostos antimicrobianos. Para tal, estudou-se o perfil e distribuição de plasmídeos de uma colecção de 112 isolados de *S. epidermidis*, isolados de zangadoas nasais recolhidas em profissionais veterinários e estudantes de medicina veterinária, seguida da detecção de genes plasmídicos que codificam para sistemas de efluxo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Materiais

2.1.1 Estirpes bacterianas

Neste trabalho foi estudada uma colecção de 112 isolados de *S. epidermidis* obtidos a partir de zaragatoas nasais de profissionais e estudantes de Medicina Veterinária, pertencentes à colecção de culturas do Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Biocidas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa [116, 117]. Esta colecção foi previamente estudada quanto à influência do efluxo na resistência a diversos compostos antimicrobianos [120]. Foram também utilizadas diferentes estirpes controlo para a pesquisa da presença de genes plasmídicos que codificam para bombas de efluxo, estando as mesmas descritas na Tabela 1. Nos ensaios de electrotransformação, a estirpe *S. aureus* RN4220 [85] foi utilizada como estirpe receptora.

Tabela 1. Estirpes controlo utilizadas no rastreio de genes plasmídicos associados à resistência a compostos antimicrobianos.

Estirpes bacterianas	Genótipo de interesse	Referência
<i>S. epidermidis</i> ATCC®12228™	<i>tet(K)</i> ⁺ , <i>msrA</i> ⁻ , <i>cadD</i> ⁻ , <i>vga(A)</i> ⁻ , <i>vga(C)</i> ⁻ , <i>arsB</i> ⁻	[151]
<i>S. epidermidis</i> RP62A, ATCC®35984™	<i>cadA</i> ⁻ , <i>qacG</i> ⁻ , <i>qacJ</i> ⁻	[28, 46]
<i>S. aureus</i> ATCC®25923™	<i>tet(K)</i> ⁻ , <i>qacG</i> ⁻ , <i>qacJ</i> ⁻ , <i>arsB</i> ⁺	[142]
<i>S. aureus</i> H4/09	<i>qacG</i> ⁺	[32]
<i>S. aureus</i> 25.1	<i>qacJ</i> ⁺	[32]
<i>S. aureus</i> SM31	<i>cadD</i> ⁺	[28]
<i>S. aureus</i> SM39	<i>cadA</i> ⁺ , <i>qacA</i> ⁺	[28]
<i>S. aureus</i> 02/2002	<i>msrA</i> ⁺	[32]
<i>S. aureus</i> 32.1	<i>vga(A)</i> ⁺	[31]
<i>S. aureus</i> 49.1	<i>vga(C)</i> ⁺	[31]

2.1.2 Outro material biológico

Para análise de perfis plasmídicos em gel de agarose foram usados os marcadores 1 kb DNA Ladder GeneRuler™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States) e DNA λ *HindIII* (Thermo Fisher Scientific). Para análise de produtos de PCR foi utilizado o marcador 100 pb DNA Ladder Plus Gene Ruler™ (Thermo Fisher Scientific).

2.1.3 Meios de cultura, compostos e soluções

Todos os meios de cultura e soluções utilizados (Tabela 2) foram preparados com água bidestilada e esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 15 minutos à excepção do glicerol a 50% (v/v) usado na preparação de “stocks”, esterilizado a 121°C durante 10 minutos.

Tabela 2. Composição dos meios de cultura usados neste trabalho.

Meios de cultura	Composição (por litro)
TSB (Tryptone Soya Broth)⁽¹⁾	Peptona de caseína (17,0 g); peptona de soja (3,0 g); NaCl (5,0 g); K ₂ HPO ₄ (2,5 g); glucose (2,5 g); pH 7,3±0,2 a 25°C
TSA (Tryptone Soya Agar)⁽¹⁾	Peptona de caseína (15,0 g); peptona de soja (5,0 g); NaCl (5,0 g); agar (15,0 g); pH 7,3±0,2 a 25°C
Antibiotic Medium N°3⁽²⁾	1,5 g extracto de carne bovina; 1,5 g extracto de levedura; 5,0 g de peptona de gelatina; dextrose 1,0 g; 3,68 g K ₂ HPO ₄ ; 1,32 g KH ₂ PO ₄ ; 3,5 g NaCl; pH 7,0 ± 0,5 a 25 °C?
Antibiotic Medium N°3 agar⁽²⁾	Antibiotic medium N°3; 15 g agar; pH 7,3 ± 0,5 a 25 °C
“Standard minimal medium” (SMM 2X)^{(1)(*)}	1 M sacarose; 0,04M maleato de sódio; 0,04 MgCl ₂ ; pH 6,5
SMMP	Antibiotic medium N°3 2X + SMM (mistura 1:1 de Antibiotic medium n°3 4X + SMM 2X)

⁽¹⁾Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra; ⁽²⁾BD, Sparks, MD, E.U.A.; * Esterilizado por filtração com filtro de 0,2 µm (RothLab, Carl, Roth, Dm BH).

Na Tabela 3 encontra-se a composição das diversas soluções utilizadas ao longo deste trabalho.

Tabela 3. Composição e modo de preparação das soluções utilizadas.

Soluções	Composição
TAE 1X	40 mM Tris-acetato ⁽¹⁾ ; 1 mM EDTA ⁽¹⁾ ; pH 8,0 (preparado stock a 50X)
Tampão P1	50 mM Tris Base ⁽¹⁾ ; 10 mM EDTA ⁽¹⁾ ; pH a 8,0
Tampão P2	0,2 M NaOH ⁽¹⁾ ; 1% SDS (p/v) ⁽¹⁾
Tampão P3	3 M Acetato de Sódio ⁽²⁾ ; pH 4,8
TE 1X	10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA; pH 8,0
Triton X-100 ⁽¹⁾	10% (v/v) em água autoclavada
Tampão de lise	20 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA; 150 mg/L Lisostafina; 100 mg/L RNase
Soro fisiológico	0,9% NaCl ⁽³⁾
Sacarose	0,5 M sacarose ^{(1)*}

⁽¹⁾ Sigma Aldrich, St. Louis, E.U.A; ⁽²⁾ Pancreac Química SA, Barcelona, Espanha; ⁽³⁾ Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha; *Esterilizado por filtração com filtro de 0,2 µm.

As enzimas de restrição utilizadas encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Enzimas de restrição usadas neste trabalho.

Enzimas de restrição	Características
<i>EcoRI</i> ⁽¹⁾	Buffer <i>EcoRI</i> Concentração: 10 U/µL Condição de reacção: 37°C; Inactivação: 65°C, 20 minutos Local de restrição: 5'-G [↓] AATTC-3' 3'-CTTAA [↑] G-5'
<i>XbaI</i> ⁽²⁾	10x Buffer Tango Concentração: 10 U/µL Condição de reacção: 37°C Local de restrição: 5'-T [↓] CTAGA-3' 3'-AGATC [↑] T-5'

⁽¹⁾New England Biolabs Inc, Ipswich, MA, E.U.A; ⁽²⁾Fermentas, Graiciuno, Vilnius, Lituânia.

As enzimas utilizadas nos diversos protocolos de extracção de DNA encontram-se descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Outras enzimas usadas ao longo deste trabalho.

Enzimas	Solução “stock”
RNaseA ⁽¹⁾	10 mg/mL em H ₂ O bidestilada estéril, mantida em alíquotas a -20°C.
Proteínase K ⁽¹⁾	20 mg/mL em H ₂ O bidestilada estéril, mantida em alíquotas a -20°C.
Lisostafina ⁽¹⁾	15 mg/mL em H ₂ O bidestilada estéril, mantida em alíquotas a -20°C.
Plasmid-safeTM ATP-Dependent DNase ⁽²⁾	5 U/μL, mantida a -20°C

⁽¹⁾Sigma-Aldrich; ⁽²⁾ Epicenter

Na Tabela 6 encontram-se apresentados os diversos compostos antimicrobianos utilizados ao longo deste trabalho.

Tabela 6. Composição e modo de preparação de soluções de antibióticos, biocidas e metais pesados.

Solução	Preparação da solução “stock”
Brometo de etídeo (EtBr) ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada estéril Mantido ao abrigo da luz e a 4°C
Eritromicina (ERY) ⁽¹⁾	10 mg/mL em etanol a 95% Diluição em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Tetraciclina (TET) ⁽¹⁾	5 mg/mL em etanol a 95% Diluição em água bidestilada estéril Mantida a -20°C
Acetato de Cádmio anidro ⁽¹⁾	10 mg/mL em água bidestilada Diluição em água bidestilada estéril Mantido a -20°C

⁽¹⁾ Sigma Aldrich.

2.2 Métodos

2.2.1 Manutenção e condições de crescimento de bactérias

Foram mantidos “stocks” das estirpes utilizadas neste estudo a -80°C em meio líquido suplementado com 10% (v/v) de glicerol.

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio TSA e incubadas durante a noite (18 horas) a 37°C. Para crescimento em meio líquido, inocularam-se 2 ou 3 colónias isoladas em 5 mL de meio TSB, com incubação (18 horas) a 37 °C, sob agitação de 180 rpm (Incubadora Max Q 4000, ThermoFisher).

2.2.2. Extracção de DNA

2.2.2.1 Extracção de DNA total pelo método de fervura

A pesquisa de genes de resistência aos diversos compostos antimicrobianos foi feita a partir de DNA total dos 112 isolados, extraído pelo método de fervura adaptado de Alexopoulou *et al.*, 2006 [3b].

A partir de 1 mL de cultura em TSB, as células bacterianas foram recolhidas por centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos (Biofuge pico Heraeus, Kendro Laboratory). O sedimento bacteriano foi ressuspenso em 500 µL de TE suplementado com Triton X-100 1% (v/v) e 0,36 mg/mL de Proteinase K (a 20 mg/mL) e incubado em banho seco a 56°C durante 1 hora, e posteriormente em banho-maria a 100°C durante 5 minutos. De seguida, a solução foi arrefecida em gelo e efectuou-se nova centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos para permitir a recolha do sobrenadante contendo o DNA total para novo tubo. O DNA total foi mantido a -20°C.

2.2.2.2 Extracção de DNA cromossómico por QIAamp DNA Mini Kit

O DNA cromossómico das estirpes controlo, utilizado para optimização de condições de reacções de PCR, foi extraído com o kit QIAGEN “QIAamp DNA Mini Kit” (Hilden, Alemanha).

A partir de 1 mL cultura em TSB recolheram-se células bacterianas por centrifugação a 13.000 rpm durante 10 minutos. O sedimento celular foi lavado em 1 mL de tampão TE, ressuspendido em 180 µL de tampão de lise (Tabela 3) e incubado a 37°C durante 30 minutos até se obter uma lise completa (suspensão límpida e viscosa). De seguida, adicionaram-se 2 mg/mL de Proteinase K e 200 µL de tampão AL. Incubou-se a suspensão a 56°C durante 30 minutos e de seguida a 95°C durante 15 minutos deixando-se arrefecer o tubo. Após este passo, adicionou-se 200 µL de etanol (96-100%), ressuspendendo no vortex durante aproximadamente 15 segundos. A totalidade da mistura foi então transferida para uma coluna QIAamp, e centrifugada a 8.000 rpm durante 1 minuto. De seguida adicionou-se 500 µL de tampão AW1 e realizou-se nova centrifugação nas mesmas condições. Transferiu-se a coluna para novo tubo, adicionou-se 500 µL de tampão AW2 e centrifugou-se a 13.000 rpm durante 3 minutos. Transferiu-se a coluna para um novo tubo de 1,5 mL e o DNA foi eluído adicionando 200 µL de tampão AE, incubado à temperatura ambiente durante 5 minutos, para posterior centrifugação a 8.000 rpm durante 1 minuto. Por fim descartou-se a coluna e centrifugou-se o eluato a 13.000 rpm durante 3 minutos, retirando-se o sobrenadante para novo tubo. O DNA foi mantido a -20°C para posterior utilização.

2.2.2.3 Extracção de DNA plasmídico por lise alcalina

A extracção de DNA plasmídico para análise de perfis de restrição foi feita com base numa modificação do método de lise alcalina, o qual consiste na lise mecânica e enzimática das células bacterianas [125].

A partir de 1,5 mL de cultura em TSB recolheram-se células bacterianas por centrifugação a 13.000 rpm durante 5 minutos. De seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano ressuspendido em 100 µL de tampão P1 suplementado com 100 mg/L de RNase, raspando o tubo numa superfície rugosa. Foram adicionados 40 mg/L de

lisostafina e incubou-se a suspensão a 37 °C durante 90 minutos ou até completar a lise celular (solução límpida e viscosa). De seguida, adicionaram-se 200 µL de tampão P2, misturando por inversão, e incubou-se durante 5 minutos em gelo. Posteriormente, adicionou-se 150 µL de tampão P3, levou-se ao vortex brevemente, incubou-se em gelo durante 10 minutos e centrifugou-se a suspensão a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C (Sigma, modelo 3K-18). O sobrenadante (cerca de 400 µL) foi transferido para um tubo contendo 1 mL de etanol absoluto gelado, misturando por inversão e incubando por 1 hora à temperatura ambiente. Após incubação, realizou-se nova centrifugação a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 500 µL de etanol 80% gelado sem misturar e centrifugou-se a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante deixando os tubos a secar em estufa a 37°C durante 15 minutos. Por fim, ressuspendeu-se o DNA plasmídico em 40 µL de água mili-QTM autoclavada, vortexando brevemente. O DNA plasmídico foi mantido a -20°C.

Todas as preparações de DNA plasmídico foram analisadas em gel de agarose a 1,5% (p/v) durante 90 minutos a 80V (10 µL DNA plasmídico) sendo corado posteriormente em banho de brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e observado num aparelho Gel-Doc XR (BioRad, Milão, Itália). Quando necessário, o DNA plasmídico foi tratado com a enzima Plasmid-SafeTM ATP-Dependente DNase (37°C, durante 2 horas), a qual degrada DNA cromossómico contaminante sem afectar o DNA plasmídico.

2.2.2.4 Extracção de DNA plasmídico por kit- QIAGEN “Plasmid Midi Kit”

O isolamento de DNA plasmídico foi efectuado pelo QIAGEN “Plasmid Midi Kit”, utilizando o protocolo para plasmídeos de baixo número de cópias, com o objectivo de obter maior concentração de DNA plasmídico para posterior utilização no protocolo de electrotransformação.

A partir de uma cultura fresca em TSA transferiu-se uma colónia isolada para 5 mL de TSB, incubando-se por 8 horas a 37 °C sob agitação a 180 rpm. Neste ponto, foi transferido 1 mL de cultura para um frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de meio TSB (diluição 1:100), incubando-se a 37 °C durante 16-18 horas a 180 rpm.

As células bacterianas foram recolhidas por centrifugação a 6.000 rpm durante 15 minutos a 4°C (Sigma, modelo 2-16PK) e ressuspensas em 4 mL de tampão P1 complementado com 35 mg/L de lisostafina. A lise celular foi então realizada a 37 °C durante 90 minutos. Após a lise foram adicionados 4 mL de tampão P2 misturando por inversão 4 a 6 vezes e incubando à temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, adicionaram-se 4 mL de tampão P3 gelado misturando a solução imediatamente por inversão 4 a 6 vezes e incubando-se em gelo durante 15 minutos. De seguida, efectuou-se uma centrifugação a 12.000 rpm durante 30 minutos a 4°C (BHG HERMLE ZK 380, Alemanha) transferindo-se o sobrenadante para novo tubo para nova centrifugação agora durante 15 minutos. Após a centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para uma coluna QIAGEN-tip 100, previamente equilibrada com 4 mL de tampão QBT, deixando filtrar por gravidade. A coluna foi lavada 2 vezes com 10 mL de tampão QC, e o DNA eluído com 5 ml de tampão QF. Depois de eluído precipitou-se o DNA com 3.5 mL de isopropanol, seguido de centrifugação a 11.000 rpm durante 30 minutos a 4°C decantando-se cuidadosamente o sobrenadante. Por fim lavou-se o sedimento contendo o DNA plasmídico com 2 mL de etanol a 70%, efectuando-se uma última centrifugação a 11.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Cuidadosamente, decantou-se o sobrenadante, e o “pellet” foi seco durante 5 a 10 minutos à temperatura ambiente, tendo sido por fim ressuspensado em 200 µL de tampão TE.

O produto de DNA plasmídico foi então quantificado no espectrofotómetro NanoDrop-1000 (Thermo Scientific).

2.2.3 Restrição de DNA plasmídico

A restrição de DNA plasmídico é um método utilizado para a determinação e comparação de perfis plasmídicos. Através desta técnica foi possível estimar o tamanho dos plasmídeos de alguns isolados recorrendo-se ao “software” BioNumerics (Applied Maths) que determina e compara os diversos pesos moleculares dos fragmentos de DNA. Para cada ensaio de restrição, foi preparada uma mistura reaccional com um volume final de 20 µL, contendo 10 µL de DNA plasmídico (obtido por lise alcalina), 1,5 µL *EcoRI* (15 U), 2 µL do respectivo tampão da enzima (concentração final a 1X), perfazendo-se o volume com 6,5 µL de água bidestilada. Cada mistura reaccional foi incubada a 37 °C

durante 2 horas. Por fim, realizou-se a inactivação da enzima em banho seco a 65°C durante 20 minutos. Os perfis de restrição foram visualizados em gel de agarose 1,5% a 80 volts durante 90 minutos, usando os marcadores 1 kb DNA Ladder GeneRuler™ e DNA λ *HindIII*. Para a análise comparativa dos perfis plasmídicos e de restrição, como referido anteriormente, utilizou-se o “software” BioNumerics para a construção de dendrogramas, construídos com base nos métodos de Jaccard e UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) e com uma tolerância de posição de banda de 1%.

2.2.4 Detecção de genes associados a resistências a compostos antimicrobianos.

Para a detecção dos diferentes genes plasmídicos que codificam para bombas de efluxo recorreu-se à técnica de PCR, utilizando os pares de “primers” descritos na Tabela 7 e as estirpes controlo descritas na Tabela 1. As reacções de PCR foram realizadas em termocicladores UnoII Thermoblock (Biometra®, Goettingen, Alemanha) ou Eppendorf Mastercycler (Eppendorf AG®, Hamburgo, Alemanha).

As misturas de reacção de PCR foram preparadas num volume final de 25 μ L contendo 1X tampão *Taq* (Thermo Scientific), 2 U de *Taq* Polimerase (Thermo Scientific), 20 pmol de cada primer, 200 μ M de dNTP (NZYTech, Lisboa, Portugal) e 1,75 mM de $MgCl_2$ (Thermo Scientific). A mistura reaccional foi distribuída por tubos de 0,2 mL, aos quais foram adicionados 2,5 μ L de cada DNA a testar. Todos produtos de PCR foram analisados por electrofore em gel de agarose a 2% (p/v) durante 1 hora a 80 volts.

Tabela 7. Sequência nucleotídica dos “primers” utilizados neste trabalho e respectivo tamanho do amplicão.

Gene	Sequência de Primers (5' → 3')	Amplicão (pb)	Referências
<i>qacG</i>	Fw_CAACAGAAATAATCGGAACT	275	Este trabalho
	Rv_TACATTTAAGAGCACTACA		
<i>qacJ</i>	Fw_CTTATATTTAGTAATAGC	306	Este trabalho
	Rv_GATCCAAAAACGTTAAGA		
<i>msrA</i>	Fw_GATTGTCCCAAGCCAGTAAA	445	Este trabalho
	Rv_GCCATTTGCACTTTAGGAGA		
<i>cadA</i>	Fw_CCAAAGCGGTAGATGACGAA	553	[28]
	Rv_GCAAGTGGATGTTGTGAACG		
<i>cadD</i>	Fw_GGTGTATTATGATTCAAACGGT	614	[28]
	Rv_TCCTAAAATTGTTTGAATAGTG		
<i>arsB</i>	Fw_GCGAGTTTATCCAAATTCCTG	476	Este trabalho
	Rv_CCACGAAATCTTCACACCTTT		
<i>vga(A)</i>	Fw_ACCCGAGACATCTTCACCAC	400	[31]
	Rv_GGAAATTGACGAGGGGAGA		
<i>vga(C)</i>	Fw_GCTAAGCGGTGGTGAAAGAG	369	[31]
	Rv_AAAGCTTGGGAAGGTTCCAT		
<i>tet(K)</i>	Fw_GTAGCGACAATAGGTAATAGT	361	Este trabalho
	Rv_GTAGTGACAATAAACCTCCTA		

pb: pares de bases; Fw- “forward”; Rv- “reverse”

As condições utilizadas para amplificação dos diferentes fragmentos internos dos genes alvo estudados encontram-se descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Programas para amplificação de fragmentos internos dos vários genes estudados.

Gene	Programa de amplificação	Referência	Gene	Programa de amplificação	Referência
<i>qacG</i>	95 °C – 4 min 95 °C – 30 seg 48 °C – 30 seg 72 °C – 30 seg 72 °C – 5 min } 35x	Este trabalho	<i>qacJ</i>	95 °C – 4 min 95 °C – 30 seg 46 °C – 30 seg 72 °C – 30 seg 72 °C – 5 min } 35x	Este trabalho
<i>msrA</i>	95 °C – 4 min 95 °C – 30 seg 50 °C – 30 seg 72 °C – 30 seg 72 °C – 5 min } 35x	Este trabalho	<i>cadA</i>	94 °C – 4 min 94 °C – 30 seg 52 °C – 60 seg 72 °C – 30 seg 72 °C – 5 min } 35x	[28]
<i>cadD</i>	94 °C – 3 min 94 °C – 60 seg 48 °C – 60 seg 72 °C – 60 seg 72 °C – 5 min } 30x	[28]	<i>arsB</i>	95 °C – 3 min 95 °C – 45 seg 52 °C – 45 seg 72 °C – 45 seg 72 °C – 5 min } 35x	Este trabalho
<i>tet(K)</i>	94 °C – 4 min 94 °C – 30 seg 55 °C – 30 seg 72 °C – 30 seg 72 °C – 5 min } 35x	Este trabalho	<i>vga(A)</i>	94 °C – 3 min 95 °C – 60 seg 55 °C – 60 seg 72 °C – 60 seg 72 °C – 5 min } 30x	[31]
<i>vga(C)</i>	94 °C – 3 min 95 °C – 60 seg 51 °C – 60 seg 72 °C – 60 seg 72 °C – 5 min } 35x	[31]			

2.2.5 Electrotransformação

O processo de electrotransformação [69, 89] teve como principal objectivo a determinação da localização (plasmídeo ou cromossoma) de alguns dos genes associados a resistência mediada por efluxo. Utilizou-se como receptora a estirpe de *S. aureus* RN4220, por apresentar deficiência nos sistemas de restrição devido a mutações nos genes *sauI hsdR* [85].

2.2.5.1 Preparação de células electrocompetentes

A partir de uma cultura crescida “overnight” de *S. aureus* RN4220 em meio TSB, transferiram-se 2 mL para um frasco Erlenmeyer com 98 mL de TSB (diluição 1:50), incubou-se a 37 °C e 180 rpm até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,6 [69]. De seguida recolheram-se as células por centrifugação a 9.000 rpm durante 10 minutos (Sigma, modelo 2-16PK), sendo o sedimento lavado com igual volume de sacarose 0,5 M, voltando-se a centrifugar nas mesmas condições. Procedeu-se a mais duas lavagens com 0,5X e 0,1X de volume de sacarose 0,5 M. Por fim, o sedimento foi ressuspendido em 1 mL de sacarose 0,5 M, distribuindo-se a suspensão celular em alíquotas de 0,2 mL e, mantidas em gelo para utilização imediata ou armazenadas a -80°C.

2.2.5.2 Processo de electrotransformação e selecção

Para o processo de electrotransformação misturaram-se 50 µL de células electrocompetentes (mantidas em gelo) com 0,1 a 1 µg de DNA plasmídico extraído a partir do kit QIAGEN “Plasmid Midi Kit”, numa “cuvette” de electroporação de 0,2 cm (BioRad), previamente arrefecida em gelo. A mistura foi mantida em gelo durante 15 minutos e a “cuvette” depois colocada na câmara de amostra (BioRad Gene Pulser II Electroporation System) e sujeita a um único pulso a 25 µF, 2.5 KV e 100 Ω. Imediatamente após o pulso, adicionou-se 1 mL de meio SMMP, misturando-se com pipeta. A suspensão celular foi então transferida para um microtubo 1,5 mL e incubada durante 1 hora a 37 °C sob agitação a 180 rpm. Após este período, prepararam-se diluições seriadas (1:10) até 10⁻¹² das células competentes (controlo) e electroporadas em 900 µL meio SMMP, sendo posteriormente semeadas (100 µL/placa) em meio “Antibiotic medium nº3” agar, suplementado com concentrações de antibiótico e/ou biocidas de interesse. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 a 48 horas.

3. Resultados

Os resultados obtidos para cada isolado analisado no presente trabalho encontram-se detalhados em Anexo, Tabela A1.

3.1 Análise de plasmídeos na colecção de *S. epidermidis* em estudo

3.1.1 Detecção de plasmídeos

A colecção de 112 isolados de *S. epidermidis* de colonização nasal em profissionais e estudantes de Medicina Veterinária foi estudada quanto à presença e diversidade de plasmídeos, nomeadamente através do método de extracção por lise alcalina, tendo-se verificado a presença de plasmídeos nos 112 isolados estudados.

Os plasmídeos detectados foram categorizados de acordo com os respectivos pesos moleculares [28, 90], obtendo-se assim três grupos: plasmídeos pequenos (<3 kb), plasmídeos intermédios (3-10 kb) e plasmídeos grandes (≥ 23 kb) (Figura 5, Tabela A1, Anexo I).

Através da análise de padrões electroforéticos, observou-se que dos 112 isolados, 38 (33,9%) possuem um plasmídeo, 29 (25,9%) possuem dois plasmídeos e 45 (40,2 %) possuem três ou mais plasmídeos. Dentro dos isolados com um plasmídeo, a maioria (n = 29) possui um plasmídeo de grandes dimensões (≥ 23 kb), seguindo-se seis isolados com um plasmídeo de tamanho intermédio (3-10 kb) e três isolados com plasmídeos pequenos (< 3 kb). Dos 29 isolados com dois plasmídeos, 25 possuem pelo menos um plasmídeo de grandes dimensões (≥ 23 kb) (Tabela A1). Dos restantes quatro isolados, três possuem um plasmídeo intermédio e um pequeno, e um isolado apresenta dois plasmídeos pequenos. Por fim, dos 45 isolados com três ou mais plasmídeos, todos possuem pelo menos um plasmídeo de grandes dimensões. De uma maneira geral, verificou-se uma elevada frequência (88,4%) de plasmídeos de grandes dimensões na colecção em estudo (Figura 5, Tabela A1, Anexo I).

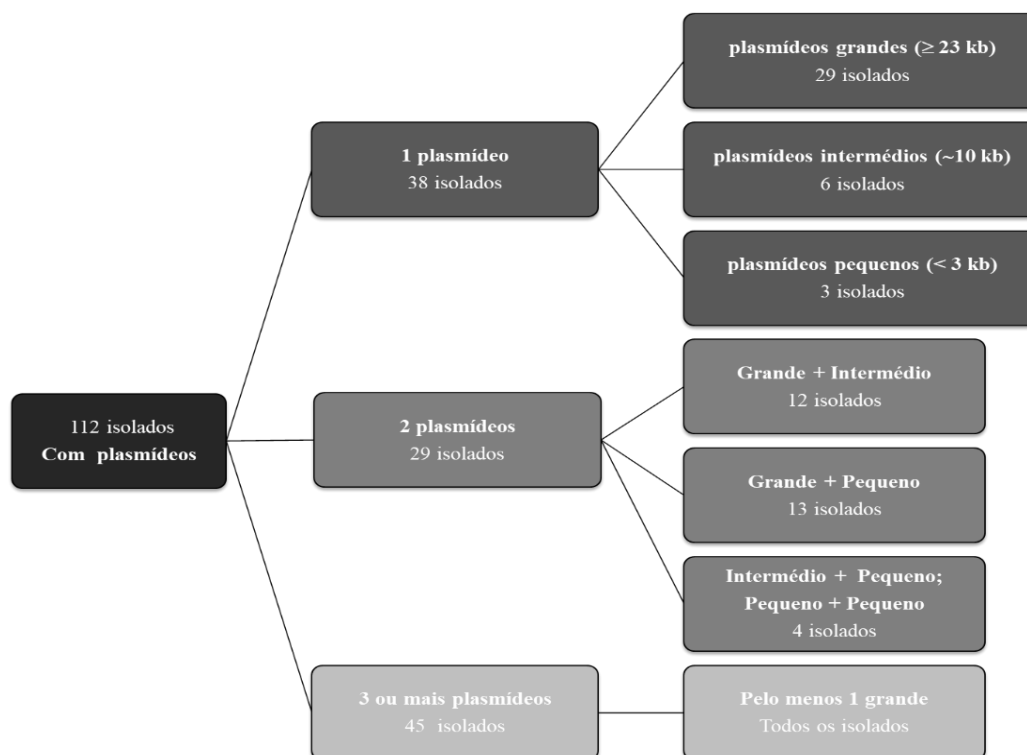


Figura 5. Distribuição dos plasmídeos detectados na colecção de *S. epidermidis* em estudo (n=112).

3.1.2 Análise de perfis *EcoRI*

Depois de efectuada a extracção dos plasmídeos da colecção em estudo, estes foram sujeitos a restrição com a enzima *EcoRI*, para possibilitar uma análise comparativa dos mesmos (Figura 6).

Esta análise permitiu estimar o tamanho dos diferentes plasmídeos nos casos de isolados que possuíam um ou dois plasmídeos (Tabelas 9 e 10). Para alguns isolados com dois ou mais plasmídeos, obteve-se um padrão electroforético complexo e de difícil interpretação, pelo que não foi possível estimar o tamanho desses plasmídeos.

Para o cálculo do tamanho dos plasmídeos recorreu-se ao “Software” ImageLab™ (BioRad), analisando os perfis de restrição e fazendo a soma dos tamanhos dos fragmentos de digestão obtidos, usando o marcador de pesos moleculares 1 kb DNA Ladder GeneRuler™ como referência.

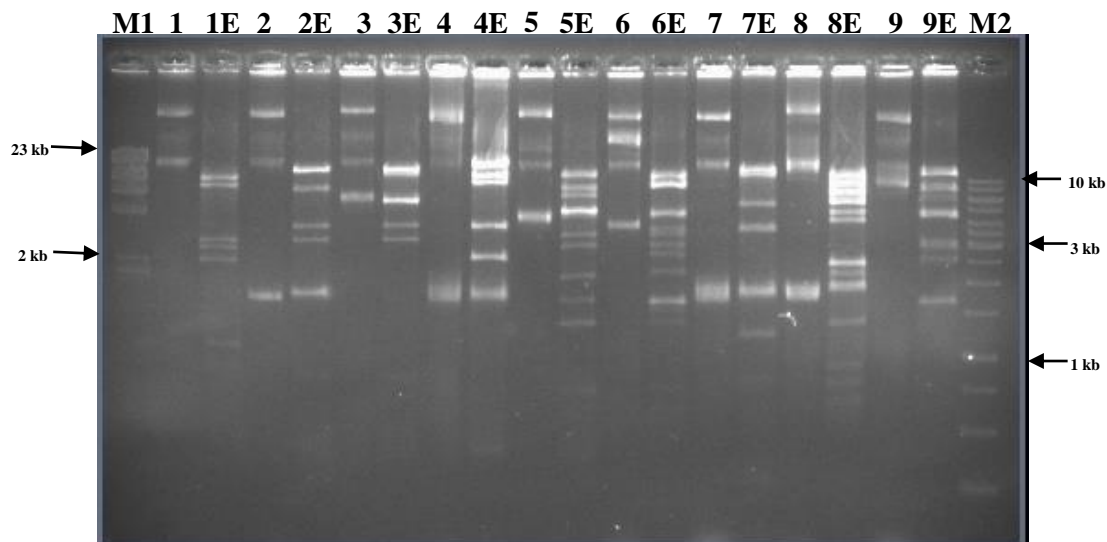


Figura 6. Exemplos de padrões electroforéticos de plasmídeos de *S. epidermidis*, antes e após restrição com *EcoRI*. Padrões resolvidos por electroforese em gel de agarose 1,5% (p/v). **M1:** Marcador DNA λ *HindIII*; **M2:** Marcador Gene Ruler DNA Ladder 1 kb; **1:** FMV117; **2:** FMV119; **3:** FMV121; **4:** FMV122; **5:** FMV123; **6:** FMV128; **7:** FMV130; **8:** FMV134; **9:** FMV136. A letra **E** corresponde aos produtos de restrição com *EcoRI* do respectivo plasmídeo.

Esta análise permitiu observar que os plasmídeos classificados como grandes (> 23 kb), apresentavam um tamanho entre 15 kb e 48,3 kb. No caso dos plasmídeos classificados como intermédios (cerca de 10 Kb), os tamanhos estimados variaram entre os 8,8 kb e 14,8 kb. Para os plasmídeos pequenos (< 3 kb) verificou-se que o tamanho destes variava entre 1,1 kb e 1,95 kb (Tabelas 9 e 10, Tabela A1, Anexo I).

Tabela 9. Isolados com um plasmídeo e Tabela 10. Isolados com dois plasmídeos e respectivo tamanho.

Isolado	Nº de plasmídeos	Classificação (G, I, P)	Tamanho estimado (kb)	Isolado	Nº de plasmídeos	Classificação (G, I, P)	Tamanho estimado (kb)
FMV-23	1	G	33,7	FMV-22	2	G + P	26,2 + 1,68
FMV-24	1	P	1,73	FMV-26	2	G + I	(a)
FMV-25	1	G	20,86	FMV-31	2	G + P	32,51 + 1,85
FMV-27	1	I	10	FMV-33	2	P + P	3,47 + 1,08
FMV-30	1	G	31,28	FMV-34	2	G + I	(a)
FMV-35	1	I	14,56	FMV-37	2	G + I	(a)
FMV-36	1	G	18,67	FMV-39	2	G + P	17,04 + 1,63
FMV-40	1	P	1,58	FMV-47	2	G + I	(a)
FMV-41	1	I	15,83	FMV-51	2	G + P	(a)
FMV-42	1	G	23,35	FMV-55	2	G + P	(a)
FMV-46	1	G	28,56	FMV-67	2	G + P	21,68 + 1,64
FMV-48	1	G	18,43	FMV-71	2	G + P	(a)
FMV-54	1	G	45,45	FMV-75	2	I + P	10 + 1,73
FMV-58	1	G	25,2	FMV-77	2	G + P	21,08 + 1,95
FMV-60	1	G	41,25	FMV-80	2	I + P	12,19 + 1,79
FMV-61	1	I	9,44	FMV-81	2	G + I	(a)
FMV-62	1	G	(a)	FMV-89	2	G + P	(a)
FMV-63	1	G	(a)	FMV-91	2	G + I	(a)
FMV-73	1	I	10	FMV-97	2	I + P	8,89 + 1,61
FMV-74	1	G	24,93	FMV-103	2	G + I	(a)
FMV-76	1	G	31,07	FMV-107	2	G + I	(a)
FMV-78	1	I	10	FMV-112	2	G + P	(a)
FMV-84	1	G	26,91	FMV-113	2	G + P	23,12 + 1,27
FMV-87	1	G	(a)	FMV-119	2	G + P	25,49 + 1,77
FMV-88	1	G	44,75	FMV-121	2	G + I	(a)
FMV-93	1	G	37	FMV-122	2	G + P	26,59 + 1,81
FMV-99	1	G	35,77	FMV-123	2	G + I	(a)
FMV-101	1	G	(a)	FMV-129	2	G + I	(a)
FMV-109	1	G	(a)	FMV-136	2	G + I	(a)
FMV-110	1	G	(a)				
FMV-115	1	G	48,35				
FMV-116	1	G	29,5				
FMV-117	1	G	29,23				
FMV-118	1	G	30,75				
FMV-124	1	G	26				
FMV-132	1	G	(a)				
FMV-135	1	G	32,97				
FMV-137	1	P	1,55				

a)- A partir da análise dos perfis de restrição não foi possível calcular o tamanho dos plasmídeos;

G- Plasmídeos de grandes dimensões; I - Plasmídeos de tamanho intermédio; P- Plasmídeos de pequenas dimensões.

Na Figura 7 estão representados alguns exemplos dos perfis plasmídicos obtidos para a coleção em estudo, em paralelo com o respectivo perfil de restrição.

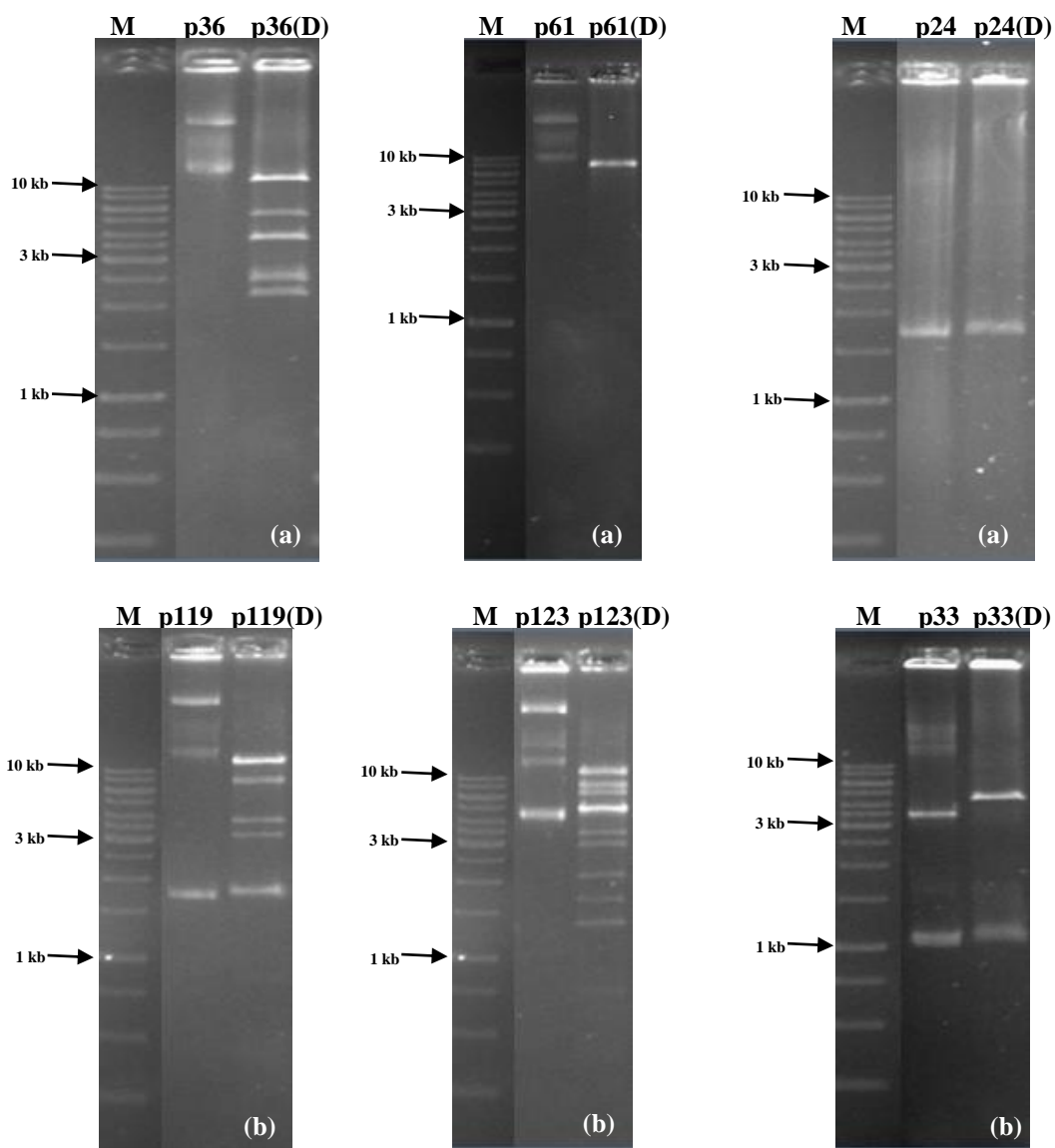


Figura 7. Perfis plasmídicos (P) e de restrição com a enzima *EcoRI* (E), em gel de agarose a 1,5% (p/v). (a) Isolados com um plasmídeo; **p36:** plasmídeo grande; **p61:** plasmídeo intermédio; **p24:** plasmídeo pequeno; (b) Isolados com dois plasmídeos **p119:** plasmídeos grande e pequeno; **p123:** plasmídeos grande e intermédio; **p33:** plasmídeos pequenos; **M:** Marcador Gene Ruler DNA Ladder 1 kb.

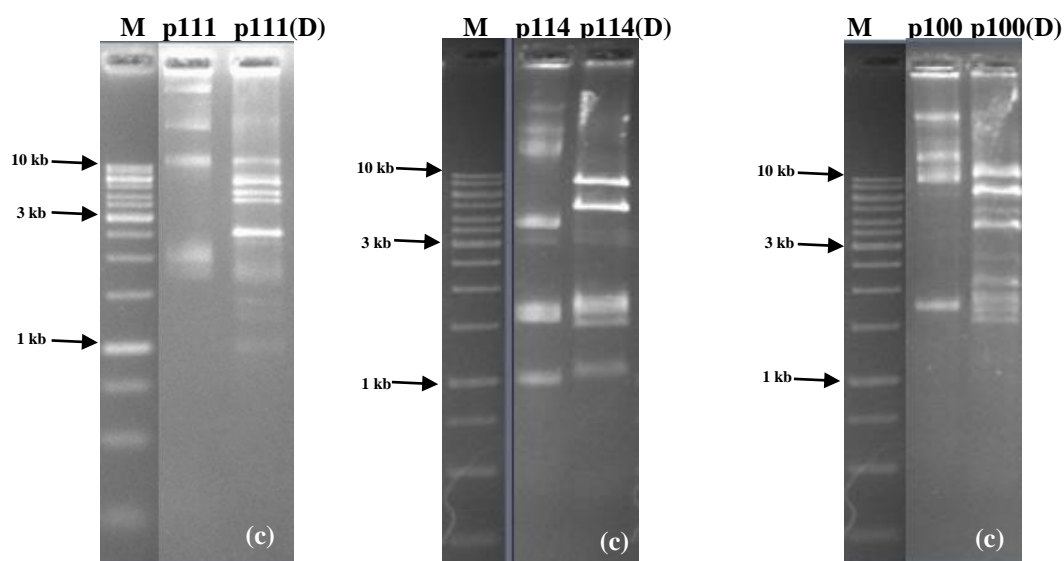


Figura 7 (Continuação). Perfis plasmídicos (P) e de restrição com a enzima *EcoRI* (E), em gel de agarose a 1,5% (p/v). (c) Isolados com 3 ou mais plasmídeos (p111, p114, p100); M: Marcador Gene Ruler DNA Ladder 1 kb.

A interpretação destes perfis plasmídicos sofreu algumas dificuldades entre as quais, a presença de DNA cromossómico contaminante e de diferentes conformações do DNA plasmídico (circular, super-enrolado e linearizado), assim como a restrição incompleta de DNA plasmídico. Para contornar o problema de DNA cromossómico contaminante, algumas preparações de plasmídeos foram tratadas com DNase “Plasmid Safe”, uma enzima DNase que não degrada DNA plasmídico. No entanto este procedimento não se revelou eficaz na eliminação de DNA cromossómico contaminante nestas preparações, provavelmente devido à sua elevada concentração.

3.2 Detecção de genes de bombas de efluxo que conferem resistência a antibióticos

Uma vez caracterizado o perfil plasmídico da colecção de *S. epidermidis* em estudo, procedeu-se à detecção de genes que codificam para bombas de efluxo que estejam associados à resistência a antibióticos ou susceptibilidade reduzida a biocidas e metais pesados. Os genes pesquisados foram escolhidos com base na sua localização preferencial ou comum em plasmídeos de várias espécies de estafilococos, incluindo *S. epidermidis*,

tendo a sua detecção sido efectuada a partir de DNA total extraído pelo método de fervura [131].

Com base nos perfis de susceptibilidade a antibióticos e biocidas previamente estabelecidos por difusão em disco ou determinação de CMI [120], Costa *et al.*, [dados não publicados], optou-se pela pesquisa de genes envolvidos na resistência a macrólidos, tetraciclina, lincosamidas e ainda a diversos biocidas e aos metais pesados cádmio e arsenato.

3.2.1 Resistência por efluxo a macrólidos

Em trabalhos anteriores com a colecção em estudo, verificou-se que 57 isolados (50,9%) apresentavam um fenótipo de resistência à eritromicina [120]. De entre os vários genes associados à resistência a macrólidos em estafilococos, foi pesquisada a presença do gene *msrA* que codifica para a bomba de efluxo MsrA, que tem como principal substrato esta classe de antibióticos.

Foi possível confirmar a presença do gene *msrA* em 35 dos 57 isolados (61,4%) que apresentavam um fenótipo de resistência à eritromicina, pela amplificação de um produto de 445 pb, correspondente a um fragmento interno deste gene (Figura 8 e Tabela A1, Anexo I).

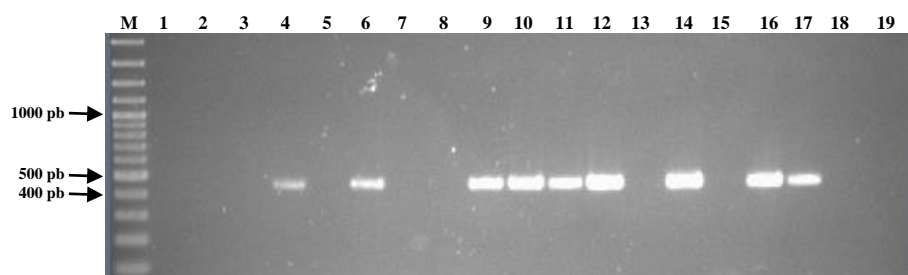


Figura 8. Electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) de produtos de amplificação do gene *msrA*. 1: FMV27; 2: FMV28; 3: FMV31; 4: FMV32; 5: FMV33; 6: FMV34; 7: FMV35; 8: FMV36; 9: FMV37; 10: FMV38; 11: FMV39; 12: FMV42; 13: FMV45; 14: FMV47; 15: FMV49; 16: FMV50; 17: Controlo positivo (*S. aureus* 02/2002); 18: Controlo negativo (*S. epidermidis* ATCC12228); 19: Controlo negativo (água MQ); M: Marcador 100pb DNA Ladder Plus Gene Ruler.

3.2.2 Resistência por efluxo às tetraciclinas

A análise dos testes de susceptibilidade a antibióticos revelou 26 isolados (23,2%) da colecção em estudo com resistência fenotípica à tetraciclina [120]. Vários genes *tet* plasmídicos estão associados à resistência por efluxo a esta classe de antibióticos [140]. Contudo, o gene *tet(K)* é o mais frequentemente detectado em estafilococos [22], razão pela qual foi pesquisado nos 26 isolados resistentes à tetraciclina.

Detectou-se a presença do gene *tet(K)* em 25 dos 26 isolados (96,2%) resistentes à tetraciclina, pela amplificação de um produto de PCR de 361 pb, correspondente a um fragmento interno deste gene (Figura 9 e Tabela A1, Anexo I).

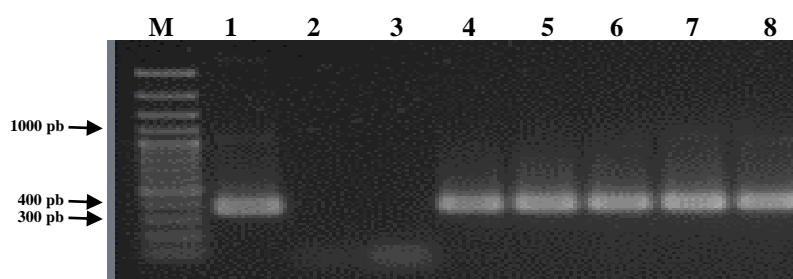


Figura 9. Electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) de produtos de amplificação do gene *tet(K)*. 1: Controlo positivo (*S. epidermidis* ATCC12228); 2: Controlo negativo (*S. aureus* ATCC25923); 3: Controlo negativo (água MQ); 4: FMV23; 5: FMV25; 6: FMV27; 7: FMV34; 8: FMV42; M: Marcador 100pb DNA Ladder Plus Gene Ruler.

3.2.3 Resistência por efluxo a lincosamidas

Na colecção em estudo foram detectados 38 isolados (34%) com resistência à clindamicina, metade dos quais (19) apresentaram resistência constitutiva a este antibiótico, enquanto a outra metade apresentou um fenótipo de resistência indutível, na presença de eritromicina [120]. Com base nestes resultados, optou-se por pesquisar os genes *vga(A)* e *vga(C)*, que de acordo com a literatura codificam para as bombas de efluxo Vga(A) e Vga(C), respectivamente, conferindo resistência às lincosamidas, podendo ainda conferir alto nível de resistências às estreptograminas A e resistência às lincomicinas e pleuromutilinas [21, 65].

No que diz respeito à detecção do gene *vga(A)*, foi possível identificá-lo em 12 dos 19 isolados (63,1%) com resistência constitutiva à clindamicina e em 3 (15,8%) dos 19 isolados com resistência indutível (Figura 10 e Tabela A1, Anexo I). A detecção deste

gene foi validada pela amplificação de um produto de PCR de 400 pb, correspondente a um fragmento interno do gene *vga(A)*.

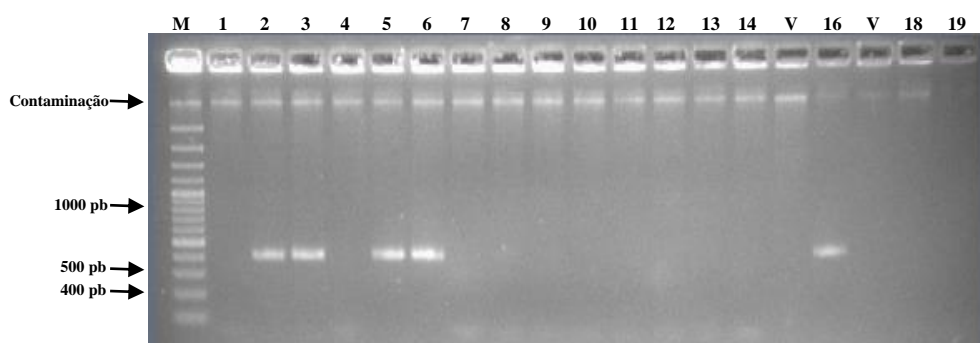


Figura 10. Electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) de produtos de amplificação do gene *vga(A)*. 1: FMV31; 2:FMV32; 3:FMV51; 4:FMV67; 5:FMV72; 6:FMV78; 7:FMV70; 8:FMV74; 9:FMV77; 10:FMV88; 11: FMV91; 12:FMV93; 13:FMV94; 14:FMV97; 16:Controlo positivo (*S. aureus* 32.1); 18: Controlo negativo (*S. epidermidis* ATCC12228); 19: Controlo negativo (água MQ); V:Poço vazio; M: Marcador 100pb DNA Ladder Plus Gene Ruler.

Relativamente ao gene *vga(C)*, verificou-se que 15 dos 19 isolados (79%) com resistência constitutiva à clindamicina possuem este gene, enquanto 15 dos 19 isolados (79%) com resistência indutível possuem igualmente o gene *vga(C)* (Figura 11, Tabela A1, Anexo I). A detecção deste gene foi validada pela amplificação de um produto de PCR de 369 pb correspondente a um fragmento interno do gene *vga(C)*. Verificou-se ainda a amplificação de um fragmento de aproximadamente 200 pb para o isolado FMV102 (Figura 11, amostra 2).

A análise conjunta dos resultados obtidos na pesquisa dos dois genes, revelou que 11 dos 19 isolados (57,9%) com resistência constitutiva à clindamicina possuem tanto o gene

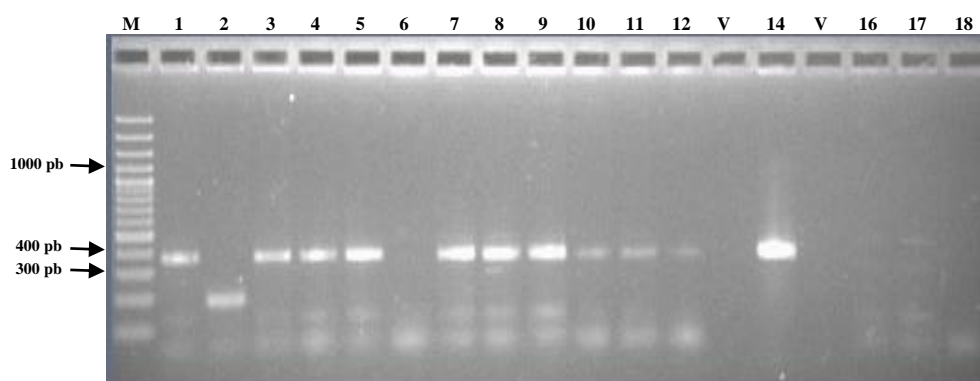


Figura 11. Electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) de produtos de amplificação do gene *vga(C)*. 1: FMV100; 2: FMV102; 3: FMV104; 4: FMV122; 5: FMV130; 6: FMV133; 7: FMV134; 8: FMV129; 9: FMV27; 10: FMV33; 11: FMV45; 12: FMV83; 14: *S. aureus*49.1 (controlo positivo); 16: Controlo negativo (*S. epidermidis* ATCC12228, DNA total); 17: Controlo negativo (*S. epidermidis* ATCC12228, DNA cromossômico); 18: Controlo negativo (água MQ); V:Poço vazio; M: Marcador 100pb DNA Ladder Plus Gene Ruler.

vga(A) como o *vga(C)* e que 2 dos 19 isolados (10,5%) com resistência indutível possuem igualmente os dois genes (Tabela A1, Anexo I).

3.3 Detecção de genes de bombas de efluxo que conferem resistência a biocidas

Com base em resultados prévios, 45 dos 112 isolados (40,2%) da colecção em estudo apresentam um fenótipo de susceptibilidade reduzida a diversos compostos biocidas [120, Costa *et al.*, dados não publicados]. É importante referir que no caso dos biocidas e metais pesados, não existem valores de “breakpoints” definidos para a classificação de resistência, razão pela qual se optou por utilizar o termo susceptibilidade reduzida em vez de resistência.

São vários os genes localizados preferencialmente em plasmídeos que codificam para bombas de efluxo envolvidas na resistência a biocidas já descritos para estafilococos [110, 136]. Num estudo prévio, foi estabelecida a correlação entre os fenótipos de susceptibilidade reduzida a biocidas dos isolados em estudo e a presença dos genes *qacA/B* e *smr* [120]. No presente trabalho, esta análise foi alargada aos genes *qacG* e *qacJ*, os quais codificam as bombas de efluxo QacG e QacJ, respectivamente, que conferem resistência a corantes como o brometo de etídio (EtBr) e a biocidas, incluindo compostos de amónio quaternário, como o cloreto de benzalcónio (BAC), entre outros.

Na Figura 12 foi feita amplificação a partir de DNA extraído por fervura e lise alcalina de maneira a determinar qual dos dois métodos de extracção seria mais eficiente aquando da amplificação dos genes *qacG* (275 pb) e *qacJ* (306 pb) nos respectivos controlos positivos.

Após efectuada a pesquisa de ambos os genes (*qacG* e *qacJ*) em todos os isolados, concluiu-se que estes não estão presentes na colecção em estudo.

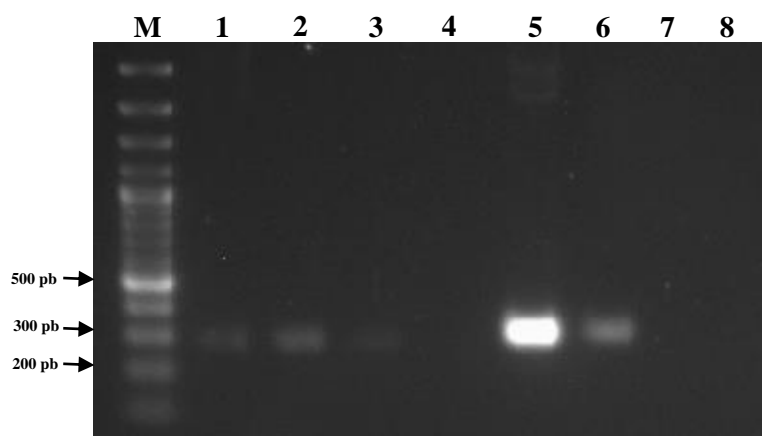


Figura 12. Gel de electroforese a 2% (p/v) para validação do PCR para amplificação dos genes *qacG* e *qacJ* a partir de DNA extraído por fervura (DNA total) e lise alcalina (DNA plasmídico). M: Marcador 100pb DNA Ladder Plus Gene Ruler; 1: *S. aureus* 25.1/*qacJ*+ (DNA plasmídico); 2: *S. aureus* 25.1/*qacJ*+ (DNA Total); 3: controle negativo (*S. epidermidis* ATCC12228); 4: controle negativo (água MQ); 5: *S. aureus* H4/09/*qacG*+ (DNA plasmídico); 6: *S. aureus* H4/09/*qacG*+; 7: controle negativo (*S. epidermidis* ATCC12228); 8: controle negativo (água).

3.4 Detecção de genes de bombas de efluxo que conferem resistência a metais pesados

A determinação prévia dos perfis de susceptibilidade a metais pesados realizada em estudos anteriores, identificou quatro isolados com susceptibilidade reduzida ao cádmio (CMI's entre 0,125 e 0,5 mM), assim como 66 isolados com susceptibilidade reduzida ao arsenato (CMI's entre 16 e > 32 mM) [Costa *et al.*, dados não publicados]. Diversos genes associados à resistência a estes compostos têm sido descritos em estafilococos, muitos dos quais frequentemente localizados em plasmídeos e que codificam para bombas de efluxo. Entre estes, foi dada atenção aos genes *cadA* e *cadD*, associados ao efluxo de cádmio e *arsB*, associado ao efluxo de arsenato [4]. A informação sobre a prevalência destes genes em *S. epidermidis* é escassa, pelo que o estudo foi iniciado com uma análise *in silico* sobre a sua distribuição na base de dados pública GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

A partir das sequências nucleotídicas dos genes *cadA*, *cadD* e *arsB*, presentes em plasmídeos ou no cromossoma de estirpes de *S. aureus*, foi realizado uma pesquisa por BlastN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) nas sequências nucleotídicas ou genomas de *S. epidermidis* disponíveis na base de dados GenBank (Tabela 11).

Para a detecção dos genes acima indicados, foi necessário realizar a optimização dos protocolos das reacções de amplificação, utilizando DNA das estirpes controlo, extraído através do kit QIAGEN “QIAamp DNA Mini Kit”.

Tabela 11. Análise *in silico* de genes de *S. epidermidis* homólogos aos genes *cadA*, *cadD* e *arsB* presentes em plasmídeos de *S. aureus*.

Gene	Estirpes <i>S.aureus</i> ; Plasmídeos; Nº acesso (NCBI)	ORF	Estirpes <i>S. epidermidis</i> ; Localização; ORF; Homologia (%)					
<i>cadD</i>	SK1271; pSK156; GQ900448 ¹	SAP099A_019		SAP108A ¹ ; (C); SAP108A_025; 92%	RP62A ² ; (C); SERP2221; 92%		SAP105A ¹ ; (P); SAP105A_015; 90%	949_S8 ¹ ; (C); UC17_09775; 92%
<i>cadA</i>	PM86; SAP076A; GQ900427 ¹	SAP076A_021				BPH0662 ¹ ; (C); BN6763_RS13265; 99%	SAP105A ¹ ; (P); SAP105A_026; 90%	
<i>cadA</i>	CM05; pCM05; GQ900387 ¹	SAP026A_040				BPH0662 ¹ ; (C); BN6763_RS13265; 93%	SAP105A ¹ ; (P); SAP105A_026; 97%	
<i>arsB</i>	CM05; pCM05; GQ900387 ¹	SAP026A_007	ATCC 12228 ² ; (C); SE_0135; 82%		RP62A ² ; (C); SERP2430; 82%			949_S8 ¹ ; (C); UC17_00130; 82%
<i>arsB</i>	ATCC 25923; pS1945; CP009362.1	KQ76_14270						

(C): DNA Cromossômico; (P) DNA plasmídico;

¹ [133, TableS2]; ² Este trabalho

3.4.1 Detecção do gene *cadA*

Previamente à detecção do gene *cadA* por PCR, foi feita uma análise comparativa das sequências nucleotídicas deste gene localizado no cromossoma ou em plasmídeos em estirpes de *S. aureus* e de *S. epidermidis* (Tabela 11) com as sequências dos “primers forward” (Figura 13) e “reverse” (Figura 14) disponíveis no laboratório.

```
S.a SAP099A_019 (P) gtcaaccaggctgctataacaggagaatctgtccctgttgccaaaacggtagatgatgaa
S.e BPH0662 (C)    gtcaaccaggctgctataacaggagaatctgtccctgttgccaaaacggtagatgatgaa
S.e SAP105A_026(P) gtcaatgaggcagctataacaggagaatctgttcccgcttccaaagcggtagatgacgaa
*****.***.*****.***.***.*****.*****.***
```

Figura 13. Sequências do gene *cadA* de três estirpes e respectivo local de ligação do “primer FW”. S.a: *S. aureus*; S.e: *S. epidermidis*; (P): plasmídeo; (C): Cromossoma; A azul está representado o local de ligação do “primer FW”. Sequência do “primer FW”- Fw_CCAAAGCGGTAGATGACGAA

```
S.a SAP099A_019 (P) gagctgttttccattattacagctttagaatatgatcacaacatccacttgcttcagca
S.e BPH0662 (C)    gagctgttttccattattacagctttagaatatgatcacaacatccacttgcttcagca
S.e SAP105A_026(P) gagctattctctaccattacagctttagaatatgttcacaacatccacttgcttcagca
*****.***.***.***.***.*****.*****.*****
```

Figura 14. Sequências do gene *cadA* de 3 estirpes diferentes e respectivo local de ligação do “primer RV”. S.a: *S. aureus*; S.e: *S. epidermidis*; (P): plasmídeo; (C): Cromossoma; A azul está representado o local de ligação do “primer RV”. Sequência do “primer RV”- Rv_GCAAGTGGATGTTGTGAACG.

Esta análise revelou que o “primer forward” diverge em dois nucleótidos quando comparado com a respectiva região de ligação no gene *cadA* localizado em plasmídeos de *S. aureus* e no cromossoma de *S. epidermidis*, não apresentando no entanto divergência com *cadA* localizado nos plasmídeos de *S. epidermidis* com sequência disponível (Figura 13). Análise semelhante para o “primer reverse” mostrou que a região de ligação diverge num único nucleótido quando comparada com as sequências nucleotídicas do cromossoma de *S. aureus* e do plasmídeo *S. epidermidis* (Figura 14). Importante referir que esta análise comparativa apenas teve em conta plasmídeos que já se encontram descritas na base de dados NCBI.

Com base nesta comparação de sequências verificou-se que não seria possível diferenciar a localização (cromossoma ou plasmídeo) do gene *cadA* usando os primers disponíveis. Para ser possível esta diferenciação, seleccionou-se uma enzima de restrição que

reconhecesse uma região interna do fragmento interno amplificado e que pudesse distinguir o gene *cadA* de origem cromossômica ou plasmídica. Para tal, recorreu-se à ferramenta de PCR “in silico” (<http://insilico.ehu.es/PCR/>), pesquisando-se uma enzima que efectuasse a restrição do produto de amplificação. Desta forma optou-se pela enzima *XbaI*, que corta unicamente o produto de amplificação correspondente ao gene *cadA* do cromossoma, resultando em dois fragmentos de 397 pb e 156 pb.

Prosseguiu-se então para a detecção e análise do gene *cadA* nos isolados da colecção em estudo, tendo-se detectado este gene em apenas três dos 112 isolados (2,7%) - FMV32, FMV76 e FMV87 (Figura 15)

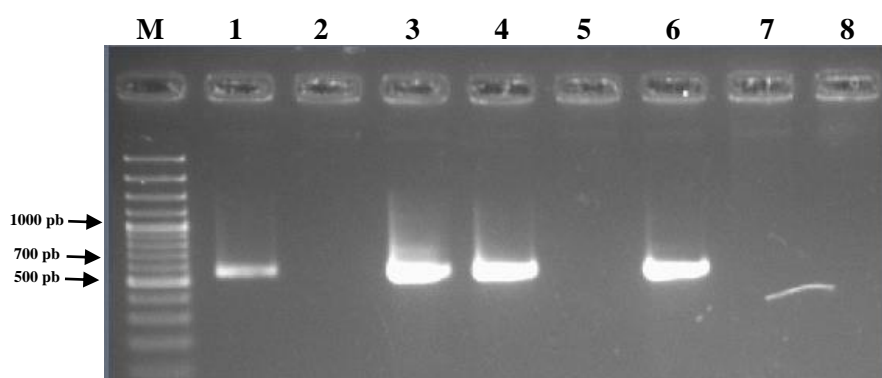
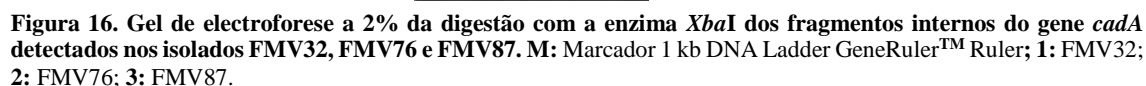


Figura 15. Electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) para detecção de produtos de amplificação do gene *cadA*. M: Marcador 100pb DNA Ladder Plus Gene Ruler; 1: FMV32; 2: FMV42; 3: FMV76; 4: FMV87; 5: FMV103; 6: *S. aureus* SM39 *cadA*⁺ (DNA plasmídico); 7: Controlo negativo (*S. epidermidis* RP62A); 8: Controlo negativo (Água MQ).

De acordo com as CMI's estabelecidas para estes isolados, apenas FMV76 e FMV87 apresentam um fenótipo de susceptibilidade reduzida a este metal; com CMI's de 0,125 e 0,5 mM, respectivamente. No caso do isolado FMV32, a CMI registada foi inferior a 0,008 mM (Costa *et al.*, dados não publicados). Relativamente à digestão com a enzima *XbaI*, o produto de amplificação *cadA* dos isolados FMV32 e FMV76 não foi digerido com esta enzima, sugerindo que nestes casos o gene *cadA* está localizado em plasmídeo. No caso do isolado FMV87, observou-se a ocorrência de digestão, obtendo-se duas bandas de tamanho estimado na ordem dos 397 pb e 156 pb, indicando a presença do *cadA* no cromossoma (Figura 16).

Por fim, relativamente ao isolado FMV87, de acordo com o resultado da digestão com *Xba*I, conclui-se que o gene *cadA* se encontra no cromossoma (Figura 16).



Como descrito para o gene *cadA*, o trabalho de pesquisa do gene *cadD* teve início com uma análise comparativa das sequências nucleotídicas deste gene localizado no cromossoma ou em plasmídeos em estirpes de *S. aureus* e de *S. epidermidis* (Tabela 11) com as sequências dos “primers forward” (Figura 17) e “reverse” (Figura 18) disponíveis no laboratório para a amplificação de um fragmento interno do gene *cadD* de 614 pb.

Figura 17. Sequências do gene *cadD* de 3 estirpes diferentes e respectivo local de ligação do “primer FW”
S.a: *Staphylococcus aureus*; **S.e:** *Staphylococcus epidermidis*; **(P):** Plasmídeo; **(C):** Cromossoma; A azul pode-se observar o local de ligação do “primer FW”. Sequência do “primer FW”- Fw GGTGTATTATGATTCAACGGT.

```

S.a.SK156 (P) attatttatatagcttttaggtttatttattattattgaaaatgacactattcaacaattttaggattta
S.e.SAP108A(P) gttatttatatagcttttaggtttatttattattattgaaaatgacactattcaacaattttaggattta
S.e.RP62A (C) gttatttacatagcttttaggtttatttcattattattgaaaatgacactattggaacaattttaggattta
*****

```

Figura 18. Sequências do gene *cadD* de 3 estirpes diferentes e respectivo local de ligação do “primer RV”. S.a: *Staphylococcus aureus*; S.e: *Staphylococcus epidermidis*; (P): plasmídeo; (C): Cromossoma; A azul pode-se observar o local de ligação do “primer RV”. Sequência do “primer RV”- Rv_TCCTAAAATTGTTGAATAGTG

Esta análise revelou que o “primer forward” diverge em pelo menos três nucleótidos quando comparado com a respectiva região de ligação do gene *cadD* localizado no plasmídeo de *S. aureus*, não apresentando divergência com *cadD* localizado em plasmídeos ou no cromossoma de *S. epidermidis* (Figura 17). Análise semelhante para o “primer reverse” mostrou que existe divergência em dois nucleótidos quando comparadas as sequências nucleotídicas do cromossoma e plasmídeo de *S. epidermidis*, sendo iguais entre os plasmídeos das duas espécies que se encontram na base de dados NCBI (Figura 18).

De maneira a diferenciar os produtos de amplificação *cadD* quanto à sua origem (cromossoma ou no plasmídeo), amplificou-se este gene a partir de DNA cromossómico da estirpe *S. epidermidis* RP62A (ATCC35984), que possui *cadD* no cromossoma e de DNA plasmídico da estirpe de *S. aureus* SM31, que possui o gene *cadD* em plasmídeo. Apenas correu amplificação do gene a partir de pSM31, validando assim a reacção de PCR para a detecção do gene *cadD* em plasmídeos de *S. epidermidis* da colecção em estudo. A aplicação deste PCR aos isolados da colecção em estudo permitiu concluir que nenhum possui o gene *cadD* em plasmídeos.

Ao cruzar estes dados com os obtidos para a detecção do gene *cadA* (Tabela A1, Anexo I), podemos deduzir que existem outros mecanismos que conferem susceptibilidade reduzida ao cádmio para alguns isolados da nossa colecção, já que se detectaram 4 isolados com CMIs relativamente altas para este composto (0,125 e 0,5 mM) (Tabela A1, Anexo 1), não tendo sido detectado nenhum dos genes estudados.

3.4.3 Detecção do gene *arsB*

Segundo estudos realizados anteriormente para a presente colecção, verificou-se uma elevada frequência de isolados com susceptibilidade reduzida ao arsenato (66/112, 59%). Desta forma, optou-se por pesquisar o gene *arsB*, envolvido no efluxo deste composto, nos plasmídeos destes isolados.

Tal como elaborado para os genes de resistência ao cádmio, efectuou-se uma análise comparativa das sequências do gene *arsB* presentes em plasmídeos de *S. aureus* [133] e presentes em *S. epidermidis* (plasmídeo e cromossoma), tendo sido detectado um gene com 82% de homologia com *arsB* do cromossoma de *S. epidermidis* (Tabela 11).

Seguiu-se uma análise dos locais de ligação dos “primers” disponíveis no laboratório para amplificação de um fragmento interno de *arsB* (476 bp) (Figura 19 e 20). Após esta análise, tentou-se otimizar a reacção de PCR para a detecção deste gene unicamente em plasmídeos de *S. epidermidis*, utilizando como controlo negativo a estirpe *S. epidermidis* ATCC 12228, que de acordo com a base de dados NCBI possui este gene apenas no cromossoma.

S.a.CM05(P) |cttgtagcgagtttatccaaattcctgtatcaattattgctgggtattattgcttttatc
S.a.ATCC25923(P) |cttgtagcgagtttatccaaattcctgtatcaattattgctgggtattattgcttttatc
S.e.949_S8 (C) |ttaataa|gtgagtttataaaatattccagttatcaattattgctgggtatcattgctttaata
S.e.RP62A (C) |ttaataa|gtgagtttataaaatattccagttatcaattattgctgggtatcattgctttaata
S.e.ATCC12228 (C) |ttaataa|gtgagtttataaacattccagttatcaattattgctgggtatcattgctttaata

Figura 19. Sequências do gene *arsB* de 5 estirpes diferentes e respectivo local de ligação do “primer FW”. S.a: *Staphylococcus aureus*; S.e: *Staphylococcus epidermidis*; (P): plasmídeo; (C): Cromossoma; A azul pode-se observar o respectivo local de ligação do “primer FW”. Sequência do “primer FW”-- Fw GCGAGTTTATCCAAATTCCTG.

S.a.CM05(P) ggttcttttagcaacattattgtggctacatgtcttaacacaaaaggtgtgaagatttcgtggga
S.a.ATCC25923(P) ggttcttttagcaacattattgtggctacatgtcttaacacaaaaggtgtgaagatttcgtggga
S.e.949_S8(C) ggttcgtagcaacacttctctggttacatgtgcttactcaaaaaggtgttaaaatttcctggga
S.e.RP62A(C) ggttcgtagcaacacttctctggttacatgtgcttactcaaaaaggtgttaaaatttcctggga
S.e.ATCC12228(C) ggttcgtagcaacacttctctggttacatgtgcttaccaaaaggtgttaaaatttcctggga

Figura 20. Sequências do gene *arsB* de 5 estirpes diferentes e respectivo local de ligação do “primer RV”
S.a: *Staphylococcus aureus*; **S.e:** *Staphylococcus epidermidis*; **(P):** plasmídeo; **(C):** Cromossoma; A azul pode-se observar o respectivo local de ligação do “primer RV”. Sequência do “primer RV”-
 RV CCACGAAATCTTACACCTTT.

Como se pode observar na Figura 19, existem 5 “mismatches” quando comparamos os cromossomas de *S. epidermidis* com os plasmídeos de *S. aureus*. Relativamente à Figura 20, podemos observar que ocorrem também 3 “mismatches”, cromossomas de *S. epidermidis* comparativamente aos plasmídeos de *S. aureus*.

Apesar da presença destas diferenças nos locais de ligação dos “primers”, após a reacção de PCR foram obtidos produtos de amplificação para a estirpe utilizada como controlo, *S. epidermidis* ATCC12228.

Para contornar esta situação, testaram-se diferentes temperaturas de emparelhamento (52°C, 54°C e 56°C) no PCR com a estirpe *S. epidermidis* ATCC12228 que não possui o gene em plasmídeo em simultâneo com a estirpe *S. aureus* ATCC25923, que sabemos possui o gene em plasmídeo. Ainda assim, continuou a ocorrer amplificação para a estirpe *S. epidermidis* ATCC12228 (Figura 21).

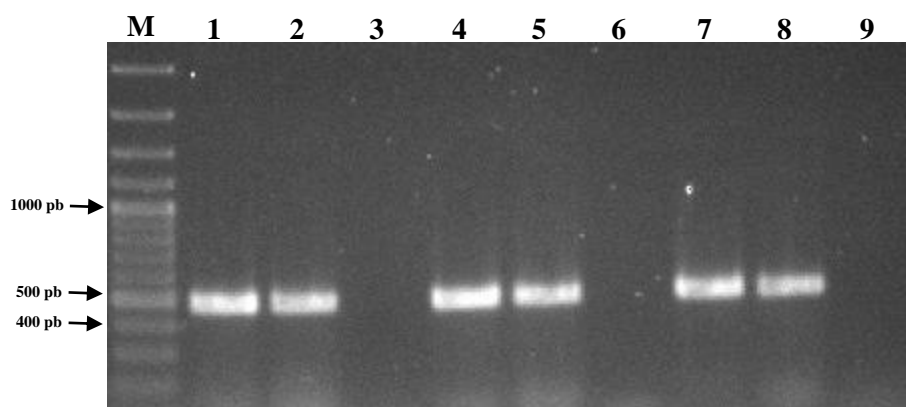


Figura 21. Gel de electroforese a 2% para testar a amplificação do fragmento interno do gene *arsB* a partir de diferentes temperaturas de emparelhamento (52°C, 54°C, 56°C). **M:** Marcador 100pb DNA Ladder Plus Gene Ruler; **1:** *S. aureus* ATCC25923 (Controlo positivo) a 52°C; **2:** Controlo negativo (*S. epidermidis* ATCC12228) a 52°C; **3:** Controlo negativo (Água MQ); **4:** *S. aureus* ATCC25923 (Controlo positivo) a 54°C; **5:** Controlo negativo (*S. epidermidis* ATCC12228) a 54°C; **6:** Controlo negativo (Água MQ); **7:** *S. aureus* ATCC25923 (Controlo positivo) a 56°C; **8:** Controlo negativo (*S. epidermidis* ATCC12228) a 56°C; **9:** Controlo negativo (Água MQ).

3.5 Electrotransformação

Após análise de todos os resultados obtidos, foram selecionados para ensaios de electrotransformação os plasmídeos dos isolados FMV76 e FMV104, uma vez que estes apresentavam genótipos e fenótipos de interesse. No caso de FMV76, este isolado possuía um único plasmídeo de cerca de 31 kb, apresentando os genes *cadA* e *msrA*, e resistência à eritromicina e susceptibilidade reduzida ao cádmio. O isolado FMV104 possui três plasmídeos de diferentes dimensões, com os genes *qacA*, *msrA*, *tet(K)* e *vga(C)*, com um fenótipo de multirresistência.

Como receptora, foi utilizada a estirpe de *S. aureus* RN4220 que, como referido nos Materiais e Métodos, é uma estirpe susceptível, que apresenta deficiência nos sistemas de restrição [85].

Depois de realizada a electrotransformação, os possíveis transformantes foram plaqueados em meio contendo os antimicrobianos de interesse, em concentrações selectivas, embora sub-inibitórias.

No caso de FMV-76 (*msrA*⁺, *cadA*⁺) a mistura de electrotransformação foi semeada na presença e ausência de 2 mg/L de eritromicina, 0,01 mM de cádmio e ainda de 2 mg/L de eritromicina e 0,01 mM de cádmio. No caso do isolado FMV-104 (*msrA*⁺, *tet(K)*⁺, *qacA*, *vga(C)*⁺), a mistura foi semeada na presença e ausência de 2 mg/L de eritromicina, 2 mg/L de tetraciclina, 16 mg/L de brometo de etídio, assim como combinações de dois e dos três compostos antimicrobianos. Após 48 horas de incubação, não se verificou crescimento de transformantes, com os plasmídeos de FMV76 ou FMV104, pelo que não foi possível prosseguir com a realização dos restantes testes para confirmação da localização dos genes de resistência de interesse nestes plasmídeos. Para tal, seria efectuada a extracção de DNA plasmídico das potenciais células transformantes, e caracterização de cada plasmídeo isolado, seguida da detecção de genes de interesse por PCR e ainda realização de novos testes de susceptibilidade aos transformantes, por difusão em disco ou determinação de CMI.

4. Discussão e Conclusões Gerais

O aumento da resistência bacteriana a compostos antimicrobianos, a nível hospitalar e na comunidade, é um dos maiores problemas de saúde pública actuais [146]. A resistência a compostos antimicrobianos tem por base inúmeros factores, incluindo o uso abusivo destes compostos, desencadeando uma pressão selectiva que resulta no aumento da resistência [146].

S. epidermidis estabelece, na maioria das vezes, uma relação benigna com o seu hospedeiro, seja ele o Homem ou animais [6]. No entanto, esta espécie é também considerada um dos principais agentes causadores de infecções nosocomiais, estimando-se ainda que uma elevada percentagem das estirpes que circulam em ambiente hospitalar seja resistentes à meticilina (MRSE) e a outros compostos antimicrobianos [6, 100, 101]. No caso dos animais, principalmente nos de companhia, este é um dos principais agentes causadores de infecções cutâneas, do tracto urinário e ainda do aparelho auditivo [10, 26, 101].

Análises genómicas comparativas revelaram que *S. epidermidis* pode ser considerada reservatório de elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, associados à resistência a compostos antimicrobianos. [6, 101]. Estes elementos, dada a sua facilidade de disseminação, inter- e intra- espécie, têm um papel epidemiológico significativo no aparecimento de novas estirpes resistentes [11, 32, 117, 127, 131].

- Estudo de perfis plasmídicos

No presente trabalho efectuou-se o estudo de perfis plasmídicos em isolados de *S. epidermidis* de colonização nasal de profissionais e estudantes de Medicina Veterinária com o objectivo de estudar a população de plasmídeos presente na colecção em estudo e genes de interesse associados. Para tal, os plasmídeos detectados foram categorizados de acordo com o seu tamanho e ainda por “fingerprinting” através da análise de perfis de restrição.

A categorização de plasmídeos poderia também ser feita através da análise de outros parâmetros, como: grupo de incompatibilidade, embora esta abordagem esteja em desuso [143]; replicação de cada plasmídeo [60, 83]; a relaxase de cada plasmídeo (MOB) [98]. A abordagem aplicada neste trabalho, “fingerprinting” por RFLP, é uma técnica rápida que pode ser facilmente usada quando o número de amostras em estudo é elevado. No entanto, os padrões de bandas obtidos podem ser difíceis de interpretar, principalmente se a(s) enzima(s) utilizadas forem de corte frequente ou se as amostras em análise não forem devidamente processadas de maneira a evitar, por exemplo, a contaminação com DNA cromossômico [71, 98].

Com base na análise dos diferentes perfis plasmídicos (antes e após restrição) foi possível concluir que todos os isolados da colecção apresentam plasmídeos, sendo a presença de dois ou mais plasmídeos prevalente (74/112, 66%). Os plasmídeos identificados nesta colecção foram categorizados em 3 grupos, de acordo com os seus pesos moleculares; plasmídeos pequenos, intermédios e grandes [28, 90]. Observou-se que 99 dos 112 isolados (88,4%) possuíam pelo menos um plasmídeo de grandes dimensões (≥ 23 kb). Diversos estudos têm associado plasmídeos de maiores dimensões ao transporte de múltiplos genes de resistência [131]. Alguns destes plasmídeos poderão ser conjugativos, sendo portadores de um conjunto de genes (*tra*) que permitem a transferência horizontal sem recurso à maquinaria de replicação da célula hospedeira ou de células vizinhas [44]. Estes plasmídeos poderão também ser transmitidos por transdução, através de bacteriófagos [77, 133, 138].

Relativamente aos plasmídeos de tamanho pequeno (< 3 kb) e intermédio (3-10 kb), a sua presença foi detectada em 64 (57,1%) e 62 (55,4%) dos 112 isolados, respectivamente. Em estafilococos, a presença de plasmídeos destas dimensões está associada à resistência a diversas classes de antibióticos e outros agentes antimicrobianos [83, 133]. Estes plasmídeos, apesar de geralmente não conjugativos, poderão ser transferidos por mobilização, ou seja, utilizando a maquinaria de plasmídeos conjugativos na sua transmissão [44] ou por transdução [90]. Em *S. epidermidis*, vários plasmídeos destas dimensões têm sido associados à resistência a tetraciclina e biocidas [129, 130, 131].

Relativamente à análise comparativa dos diferentes perfis, observou-se uma grande heterogeneidade de plasmídeos na colecção estudada, uma vez que não foram observados

perfis plasmídicos idênticos, excepto dois pares de isolados que apresentaram perfis plasmídicos semelhantes, bem como fenótipos de resistência similares. Um destes pares é constituído pelos isolados FMV52 e FMV53, ambos com três plasmídeos de dimensões aproximadas, embora o perfil de restrição do isolado FMV52 apresente bandas adicionais em relação ao isolado FMV53 (Figura 22).

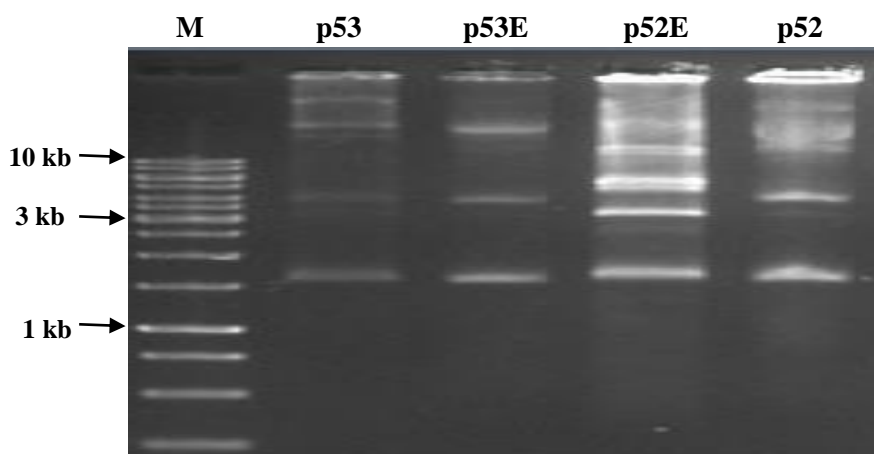


Figura 22. Perfis plasmídicos dos isolados FMV53 e FMV52, antes e após restrição com *EcoRI* (E). Padrões resolvidos por electroforese em gel de agarose 1,5% (p/v). M: Marcador Gene Ruler DNA Ladder 1 kb.

Como determinado em estudos anteriores, estes dois isolados são resistentes a beta-lactâmicos e às fluoroquinolonas ciprofloxacina e norfloxacin [120]. FMV53 é ainda resistente ao ácido fusídico e à moxifloxacina [120]. Os plasmídeos presentes nestas estirpes poderão estar associados à resistência aos beta-lactâmicos (penicilinas), através ao gene *blaZ* [96] e ao ácido fusídico (FMV53), por meio de genes *fus* [94]. A resistência às fluoroquinolonas está associada à ocorrência de mutações nos genes alvo cromossômicos *grrA/grrB* e *gyrA/gyrB* [124] e/ ou a efluxo mediado por bombas de efluxo codificadas no cromossoma [27].

O outro par com perfil plasmídico semelhante é constituído pelos isolados FMV62 e FMV63. Ambos possuem um único plasmídeo de dimensões equivalentes, que não é digerido pela enzima *EcoRI*. No que diz respeito ao genótipo/fenótipo destes dois isolados, verificou-se que possuem o mesmo fenótipo de resistência e os mesmos genes de resistência (*qacA*, *tet(K)*, *vga(C)*), indicando que estes isolados poderão transportar o mesmo plasmídeo.

Vários estudos têm sugerido a possível disseminação de plasmídeos e de determinantes genéticos associados de *S. epidermidis* para outras espécies bacterianas. Por exemplo,

num estudo realizado por Cafini *et al.*, foi testada a possível transmissão do gene *cfr* que confere resistência à linezolida, localizado em plasmídeos de duas estirpes de *S. epidermidis* para estirpes de *S. aureus* e de *Enterococcus*, tendo-se registado apenas a ocorrência de transferência para as estirpes de *S. aureus* [17]. Num estudo anterior realizado por Forbes e Schaberg em 1983, observou-se também a ocorrência de transferência de plasmídeos e concomitante transferência de genes de resistência de estirpes de *S. epidermidis* para *S. aureus* [40].

- Presença de determinantes de bombas de efluxo que conferem resistência a compostos antimicrobianos

Como já descrito neste trabalho, estão já identificados alguns sistemas de efluxo de *S. epidermidis*, cujos determinantes genéticos se encontram em plasmídeos e que conferem resistência tanto a antibióticos como a biocidas e metais pesados.

- Presença de determinantes de bombas de efluxo que conferem resistência a antibióticos

Após a análise dos diversos perfis plasmídicos obtidos, estudou-se a distribuição de genes plasmídicos que codificam bombas de efluxo na colecção em estudo. Esta pesquisa teve como ponto de partida a elevada frequência de fenótipos de resistência e multiresistência detectada anteriormente nesta colecção para diversas classes de antibióticos nomeadamente para a classe dos macrólidos, tetraciclina e lincosamidas [120].

- **Resistência aos Macrólidos**

Na bibliografia, encontram-se descritos múltiplos genes responsáveis por conferir resistência ao macrólido eritromicina, como por exemplo, os genes *erm* que codificam para metilases que modificam o alvo ribossomal dos macrólidos; o gene *mph(C)* que codifica para uma proteína inactivadora dos macrólidos [43, 62] e ainda o gene *msrA* que codifica para uma bomba de efluxo ABC e que confere resistência induzida à eritromicina e a estreptograminas do tipo B [62, 114]. Este gene foi identificado pela primeira vez em *S. epidermidis*, num plasmídeo designado pUL5050 [121]. A sua presença foi detectada

posteriormente em plasmídeos contendo outros genes de resistência (penicilinases, efluxo de tetraciclinas e metilação ribossomal) [5, 14, 62, 114]. Um estudo sobre a prevalência de resistência aos macrólidos em 77 isolados de *S. epidermidis* recolhidos de doentes com neutropenia, na Tunísia, detectou o gene *msrA* em 15% dos isolados, enquanto os genes *erm(C)* e *erm(A)* apresentaram uma prevalência de 53% e 32%, respectivamente [14]. Num outro estudo com 919 isolados de estafilococos não produtores de coagulase recolhidos em hospitais da República Checa, observou-se também que, nos isolados de *S. epidermidis*, a frequência do gene *msrA* apesar de significativa (26%), era inferior à dos genes *erm* (59%) [91].

Dados previamente estabelecidos para a colecção do nosso estudo revelaram que 57 dos 112 isolados eram resistentes à eritromicina [120]. O rastreio do gene *msrA* identificou 35 dos 57 isolados resistentes à eritromicina (61,4 %) como portadores deste gene, revelando uma frequência de 31% deste gene na nossa colecção.

No entanto, a elevada prevalência do gene *msrA* na presente colecção está de acordo com o que tem vindo a ser descrito na literatura, no sentido em que se tem vindo a registar um aumento da prevalência da resistência por efluxo mediada pelo gene *msrA* em estafilococos, podendo esta variar entre 1,6% [132] e 79% [5] em *S. aureus* e 15% [14] e 81% [73] em *S. saprophyticus*. Relativamente aos isolados negativos para este gene, e também para os isolados positivos, seria interessante alargar este estudo à detecção de outros genes que conferem resistência a antibióticos da classe dos macrólidos, como por exemplo da família *erm*.

- **Resistência às tetraciclinas**

Relativamente à classe das tetraciclinas, são conhecidos múltiplos genes envolvidos na resistência a esta classe de antibióticos, nomeadamente os genes *tet*, alguns dos quais podem estar presentes em plasmídeos [140]. No caso dos estafilococos, tem sido descrita uma elevada prevalência dos genes *tet(K)* e *tet(L)* que codificam para bombas de efluxo e ainda os genes *tet(M)* e *tet(O)*, que conferem resistência através de protecção ribossomal [130, 140].

Num estudo realizado por Schwarz *et al.*, o gene *tet(K)* foi detectado com elevada frequência em *Staphylococcus* spp. isolados de animais domésticos, incluindo *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *Staphylococcus lentus* e *Staphylococcus xylosus*. Nesse mesmo estudo observou-se ainda que os genes *tet(K)* e *tet(L)* ocorreram unicamente em plasmídeos de pequenas dimensões [130].

Dados previamente estabelecidos para a colecção em estudo, registaram resistência à tetraciclina em 26 dos 112 isolados [120] (Tabela A1). A pesquisa do gene *tet(K)*, revelou a presença deste em 25 dos 26 isolados, verificando-se assim uma elevada prevalência (96,2 %) deste gene nos isolados da presente colecção, no entanto apenas 7 dos 25 isolados positivos apresentam plasmídeos de pequenas dimensões. Um outro estudo elaborado por Schwarz *et al.*, determinou que, de 12 isolados de *S. epidermidis* resistentes à tetraciclina, recolhidos de animais domésticos, todos possuíam o gene *tet(K)* [120].

Em estudos anteriores realizou-se a pesquisa do gene *tet(L)*, não se tendo verificado a sua presença nos isolados da presente colecção (Costa *et al.*, dados não publicados). Este resultado é expectável, visto este ser um gene raramente detectado em isolados de origem humana [12].

O isolado para o qual não foi detectado *tet(K)* ou *tet(L)*, FMV128, deverá possuir outros determinantes genéticos presentes em plasmídeos ou no cromossoma que confirmam resistência à tetraciclina por outros mecanismos, como a degradação enzimática ou protecção ribossomal conferida pelo gene *tet(O)* [140].

- **Resistência às estreptograminas A, lincosamidas e pleuromutilinas**

Até ao momento, múltiplos genes associados à resistência a estreptograminas A, lincosamidas e pleuromutilinas foram já descritos. Tendo em conta o âmbito da presente Dissertação, aqueles com particular interesse são os que se encontram presentes frequentemente em plasmídeos e que codificam para sistemas de efluxo, como os genes *vga*, nomeadamente *vga(A)* e as suas duas variantes [*vga(A)_v* e *vga(A)_{LC}*], *vga(B)*, *vga(C)* e *vga(E)* [21, 78]. Entre estes genes, optou-se por efectuar o rastreio dos genes *vga(A)* e *vga(C)*, pois a sua presença em isolados de *S. epidermidis* de origem animal ou humana

já se encontra descrita [37, 148]. O gene *vga(C)* foi descrito pela primeira vez no plasmídeo multirresistente (pKKS825) de uma estirpe *S. aureus* ST398 recolhida de um isolado de origem suína [65]. Desde então, tem sido descrito em plasmídeos de pequenas dimensões de isolados somente de origem animal, com maior prevalência em animais de produção [64, 65, 147, 148].

Na colecção em estudo, o gene *vga(A)* foi identificado num total de 15 isolados (13,4%), em particular, em 12 dos 19 isolados (63,1%) com resistência constitutiva à clindamicina, e em 3 dos 19 isolados (15,8%) com resistência indutível a este antibiótico. Quanto ao gene *vga(C)*, este foi detectado em 30 dos 38 isolados resistentes à clindamicina (78,9%), particularmente, em 15 dos 19 isolados (79%) com resistência constitutiva, e em 15 dos 19 isolados (79%) com resistência indutível. Um dos isolados em estudo com resistência indutível à clindamicina (FMV102) e positivo para *vga(A)*, apresentou a amplificação de um fragmento de tamanho inesperado (cerca de 200 bp) na reacção de PCR para *vga(C)*. De futuro, seria interessante verificar por sequenciação desse fragmento, se este corresponde a um produto inespecífico ou a uma variante de *vga(C)*, originada por deleção de uma região interna do gene.

No caso do gene *vga(A)*, é importante referir que a abordagem utilizada não nos permite diferenciar *vga(A)* da sua variante *vga(A)_{LC}*, uma vez que estes diferem em apenas 10 nucleótidos [65, 92], numa região do gene que não é a amplificada pelos “primers” utilizados. Para diferenciar as duas variantes seria necessário utilizar outro par de “primers” que amplificassem uma região de divergência, efectuando-se posteriormente a sequenciação do fragmento amplificado, ou digestão com uma enzima de restrição cuja sequência de reconhecimento abarcasse um dos nucleótidos de divergência.

Alguns estudos têm reportado que *vga(A)* se encontra em transposões e em plasmídeos de estafilococos cujo tamanho pode variar entre 5,7 a 28,7 kb [148]. De acordo com os tamanhos de plasmídeos determinados anteriormente, verificou-se que os isolados *vga(A)⁺* possuem plasmídeos cujas dimensões se enquadram no intervalo mencionado.

Numa análise global, verifica-se que apesar do fenótipo de multirresistência exibido por grande parte dos isolados da colecção testada e do facto de todos possuírem pelo menos um plasmídeo, são poucos os isolados com mais do que um dos genes plasmídicos

pesquisados associados à resistência a antibióticos: *msrA*, *tet(K)*; *vga(A)* e *vga(C)* (Figura 23).

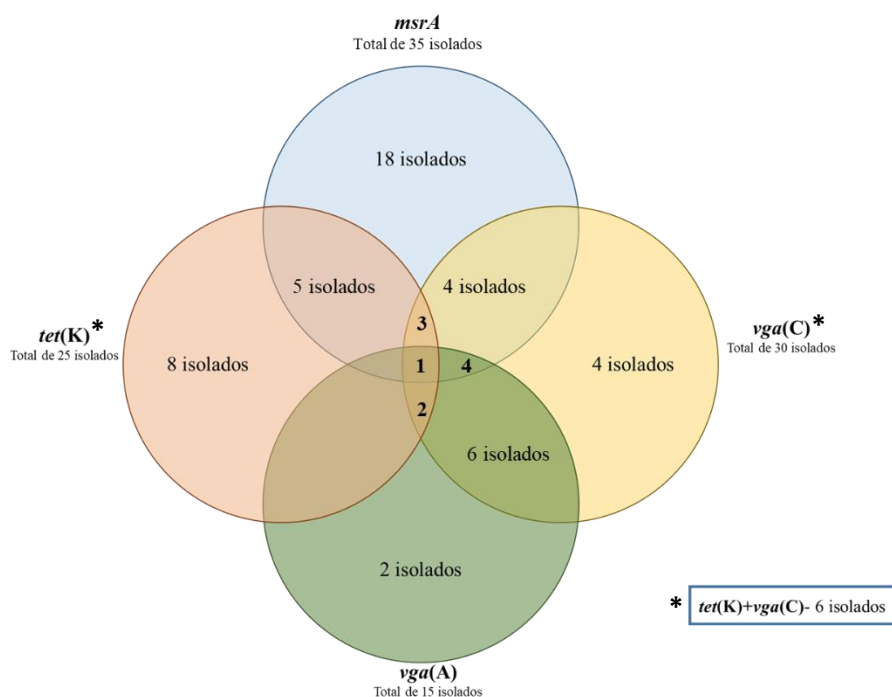


Figura 23. Diagrama de Venn representativo da distribuição dos genes plasmídicos pesquisados nos isolados de *S. epidermidis* em estudo.

Através da análise da Figura 23 e correlacionando com os perfis plasmídicos obtidos (Tabela A1), identificam-se dez isolados positivos para, pelo menos, três ou mais dos genes de resistência pesquisados. A combinação mais frequente (*msrA*⁺ *vga(A)*⁺ *vga(C)*⁺) foi detectada em quatro isolados, em que três (FMV 32, FMV100, FMV134) possuem três plasmídeos (≥23 kb + ~10 + <3 kb) e um isolado (FMV51) apresenta dois plasmídeos (≥23 kb + <3 kb). A segunda combinação mais frequente (*msrA*⁺ *tet(K)*⁺ *vga(C)*⁺), foi identificada em três isolados, nomeadamente, FMV74 com um plasmídeo de grandes dimensões (≥23 kb), e FMV94 e FMV104, ambos com três plasmídeos (grande, intermédio e pequeno). A combinação (*tet(K)*⁺ *vga(A)*⁺ *vga(C)*⁺) foi detectada em dois isolados; FMV27 com um plasmídeo intermédio e FMV129 com dois plasmídeos (grande e intermédio). Por fim, apenas um isolado, FMV81, apresentou todos os genes pesquisados (*msrA*⁺ *tet(K)*⁺ *vga(A)*⁺ *vga(C)*⁺), assim como dois plasmídeos (grande e intermédio). Esta análise combinatória revela a potencial importância dos plasmídeos presentes nesta colecção na disseminação destes determinantes de resistência. Por

exemplo, a transmissão de plasmídeos que transportam consigo o gene *vga(C)*, quer sozinho ou em combinação com outros genes, revelando assim a potencial importância da disseminação deste gene em *S. epidermidis* comensais oriundos de uma população com contacto próximo com animais.

- Detecção de genes de bombas de efluxo que conferem susceptibilidade reduzida a biocidas e metais pesados

De acordo com estudos elaborados anteriormente, 45 dos 112 isolados (40,2%) da colecção em estudo apresentam actividade de efluxo aumentada, a qual foi possível associar à presença dos genes plasmídicos *qacA/B* e *smr* em 43 desses isolados [120]. No presente trabalho, a análise foi expandida aos genes *qacG* e *qacJ*, que codificam para as bombas de efluxo QacG e QacJ, respectivamente, as quais conferem susceptibilidade reduzida a compostos de amónio quaternário (QACs) como o cloreto de benzalcónio e o brometo de cetiltrimetilamónio e ainda a corantes como o brometo de etídio (EtBr) [54, 55]. A distribuição destes genes em *S. epidermidis* e outros estafilococos é ainda pouco explorada, mas os estudos disponíveis indicam que a sua frequência é inferior à dos genes *qacA/B* e *smr*. Por exemplo, num trabalho sobre a prevalência destes genes em isolados clínicos de *S. epidermidis* recolhidos num hospital universitário sueco, verificou-se um único isolado com o gene *qacH*, não se tendo registado a presença dos genes *qacG* ou *qacJ* [110]. No entanto, um estudo mais recente por Ignak *et al.*, identificou os genes *qacJ* (36,7%) e *qacG* (32,6 %) em isolados clínicos de estafilococos e enterococos na Turquia, não tendo sido registada a presença do gene *qacH* [57]. Em relação ao presente trabalho, os genes *qacG* e *qacJ* não foram detectados em nenhum dos 45 isolados com actividade de efluxo aumentada. Estes resultados estão assim de acordo com o que se encontra descrito na literatura, em que a prevalência dos genes *qacA/B* e *smr*, detectada em estudos anteriores [120] é bastante superior em comparação com os determinantes *qacG* e *qacJ*. Para os dois isolados com efluxo aumentado para os quais não foi detectado nenhum dos genes pesquisados (FMV122 e FMV125), neste e em trabalhos anteriores [120], a maior actividade de efluxo poderá ter origem na actividade da bomba de efluxo QacH [54, 134, 145] ou de bombas de efluxo codificadas no cromossoma, como os sistemas Nor [29b,

61]. A presença destes genes e/ou a sua sobreexpressão poderia ser avaliada de futuro, de modo a identificar a origem do efluxo aumentado nestes isolados.

Neste trabalho, a detecção de determinantes genéticos que conferem susceptibilidade reduzida a metais pesados teve por base resultados obtidos em estudos anteriores para a detecção fenótipos de susceptibilidade aos metais pesados cádmio e arsenato (Costa *et al.*, dados não publicados). A inexistência de “breakpoints” para metais pesados (e outros biocidas) não permite a categorização de isolados em resistentes ou susceptíveis. No entanto, a análise da distribuição de valores de CMI, permite identificar isolados com valores de CMI aumentados. Porém, a pequena variação observada para os valores de CMI do cádmio para a população em estudo (< 0,0008 mM a 0,5 mM), levou à pesquisa de determinantes genéticos de resistência em toda a colecção. Ao contrário, a distribuição de CMIs para o arsenato revelou que 66 dos 112 isolados (59%) apresentaram valores de CMIs superiores, compreendidos entre 16 e 32 mM (Costa *et al.*, dados não publicados). Tendo em conta estes resultados, optou-se por efectuar a detecção dos genes *cadA* e *cadD*, que conferem susceptibilidade reduzida ao cádmio [33, 93], e do gene *arsB*, associado à resistência ao arsenato [56, 113].

Os genes *cadA* e *cadD* codificam para os sistemas de efluxo CadA e CadD, descritos pela primeira vez em plasmídeos de *S. aureus*, e bem caracterizados em estafilococos e outras bactérias Gram-positivas [33]. Estudos relatam a presença disseminada destes genes em plasmídeos de diversas espécies de estafilococos. Num trabalho realizado por Oger *et al.* verificou-se a presença de *cadA* em 11 espécies diferentes de estafilococos, incluindo *S. epidermidis*, obtidos das águas de um estuário [95]. Num outro estudo por Massidda *et al.*, a presença do gene *cadD* foi detectada em 28 de 30 isolados de *S. aureus* [82]. A pesquisa destes genes revelou que nenhum dos 112 isolados possuía o gene *cadD*, tendo-se detectado o gene *cadA* em apenas três isolados (Tabela A1- Anexo), o que revela uma baixa frequência de sistemas de efluxo que conferem resistência ao cádmio (2,7%) nesta colecção. Para averiguar a localização do gene *cadA* em plasmídeo ou no cromossoma, os produtos de PCR foram digeridos com a enzima *XbaI* (Figura 16, Resultados; Tabela A1- Anexo), revelando que *cadA* encontra-se potencialmente no cromossoma do isolado FMV87, e em plasmídeos dos isolados FMV76 e FMV32. Neste último isolado, a presença de *cadA* está associada a uma CMI relativamente baixa (0,008 mM), o que poderá indicar a existência de mutações ou deleções no gene que originem a sua

inactivação, ou ainda a presença de um repressor que impeça a transcrição de *cadA* [33]. Seria necessário efectuar estudos adicionais deste isolado como por exemplo, sequenciação de *cadA*, para melhor compreender o seu fenótipo e genótipo.

Para além dos determinantes analisados no presente trabalho, no que diz respeito à resistência ao cádmio, o gene *czrC* poderá estar também envolvido na resistência a este metal pesado e também ao zinco [86]. No entanto, o mecanismo de acção celular da proteína codificada por este gene é desconhecido, havendo apenas registo de esta apresentar homologia com uma ATPase transportadora de catiões [<http://www.uniprot.org/uniprot/U5LTY3>, 137]. A sua presença encontra-se descrita em clones de *S. aureus* de origem animal isolados em humanos, integrada na cassette cromossomal *SCCmec* [86]. Apesar deste gene se encontrar descrito unicamente em *S. aureus*, seria interessante efectuar a sua detecção para os isolados da colecção em estudo.

Relativamente à detecção do gene *arsB*, a análise por Blastn inicial (Tabela 11) indicou que a maioria das estirpes *S. epidermidis* sequenciadas apresenta, no seu cromossoma, um gene com elevada homologia com *arsB* de *S. aureus*. Após várias abordagens experimentais, a amplificação específica para *arsB* de origem plasmídica não foi conseguida, pelo que não se prosseguiu com o rastreio deste gene. É, no entanto, de salientar, a elevada prevalência de estirpes com CMIs elevadas a este metal na colecção em estudo, sendo necessários efectuar mais estudos para determinar se *arsB*, ou o seu homólogo, contribuem para estes fenótipos de susceptibilidade reduzida.

Conclusões Gerais

Com base nos resultados obtidos nesta Dissertação foi possível aprofundar o conhecimento de *S. epidermidis* de colonização nasal em humanos, determinando os diversos perfis plasmídicos existentes na colecção em estudo assim como a presença de genes plasmídicos que codificam para bombas de efluxo.

Verificou-se a presença de plasmídeos em todos os isolados comensais de *S. epidermidis* analisados, embora com perfis bastante heterogéneos. Para além disso, a presença de múltiplos plasmídeos foi predominante, assim como de plasmídeos de grandes dimensões. Quanto à presença de genes plasmídicos que codificam para sistemas de efluxo que conferem resistência a antibióticos, concluiu-se que existe uma elevada prevalência dos genes *tet(K)*, *msrA*, *vga(A)* e *vga(C)* nos isolados com resistência a tetraciclina, macrólidos e lincosamidas, respectivamente. Importa referir ainda que este é o primeiro estudo que relata a presença do gene *vga(C)* em isolados humanos de *S. epidermidis*. Em contraste, verificou-se uma ausência dos genes *qacG* e *qacJ*, associados à susceptibilidade reduzida a biocidas e uma baixa frequência dos genes associados à susceptibilidade reduzida a metais pesados pesquisados.

Tendo em conta que esta é uma colecção de isolados de *S. epidermidis* de colonização em profissionais e estudantes de Medicina Veterinária, uma população em contacto próximo com animais, é relevante a presença significativa de determinantes plasmídicos associados à resistência a compostos antimicrobianos, evidenciando o potencial de transmissão destes elementos entre humanos e animais. Exemplo disso, é a identificação na colecção estudada do gene *vga(C)*, até à data apenas identificado em isolados de origem animal. Os resultados obtidos mostram a importância da actividade de efluxo para a resistência a compostos antimicrobianos em *S. epidermidis*. A presença de plasmídeos em isolados comensais demonstra a sua relevância na propagação de determinantes de resistência entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes.

Numa perspectiva futura, seria interessante aplicar as metodologias utilizadas neste trabalho a outras colecções de origem distinta, nomeadamente de colonização em animais e de infecção em animais e humanos, para explorar possíveis vias de transmissão de determinantes de resistência entre humanos e animais. Para a presente colecção seria ainda interessante o estudo do modo de replicação dos plasmídeos detectados (não

conjugativos, conjugativos, mobilizáveis), assim como alargar a pesquisa a outros determinantes de resistência, associados a efluxo ou a outros mecanismos.

Em resumo, após a elaboração deste trabalho concluiu-se que existe uma grande variedade de plasmídeos e também de genes de resistência, nomeadamente de sistemas de efluxo, que são codificados nestes elementos móveis. . Evidencia-se assim a importância de monitorizar e caracterizar estes elementos, de modo a compreender melhor as suas vias de disseminação e de genes de resistência aos diferentes compostos antimicrobianos que possam transportar, em estafilococos de origem humana e animal, tendo em conta a sua relevância directa e numa perspectiva mais abrangente, enquadrada no contexto de “OneHealth”.

5. Referências Bibliográficas

1. **Adam CP, Fournier GP, Gogarten JP.** Multilevel populations and the evolution of antibiotic resistance through horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol Rev.* 2011 Sep;35(5): 756-67.
2. **Alekshun MN, Levy SB.** Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.* 2007 Mar;128(6):1037-50.
3. **Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J.** Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* 2010 Apr;8(4):251-9.
- 3b. **Alexopoulou K, Foka A, Petinaki E, Jelastopulu E, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I.** Comparison of two commercial with PCR restriction fragment length polymorphism of the *tuf* gene in identification of coagulase-negative staphylococci. *Lett Appl Microbiol.* 2006;43(4): 450-4.
4. **Argudín MA, Butaye P.** Dissemination of metal resistance genes among animal methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. *Res Vet Sci.* 2016 Apr;105:192-4.
5. **Argudín MA, Mendoza MC, Martín MC, Rodicio MR.** Molecular basis of antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from young healthy carriers in Spain. *Microb Pathog.* 2014 Sep;74:8-14.
6. **Argudín MA, Vanderhaeghen W, Vandendriessche S, Vandecandelaere I, Xavier FA, Denis O, Coenye T, Butaye P.** Antimicrobial resistance and population structure of *Staphylococcus epidermidis* recovered from animals and humans. *Vet Microbiol.* 2015 Jul;178(1-2):105-13.
7. **Bannerman, T. L.** *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., vol. 1: American Society for Microbiology, Washington, D.C; 2003. p. 384-404
8. **Bay DC, Rommens KL, Turner RJ.** Small multidrug resistance proteins: A multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Sep;1778(9):1814-38.

9. **Bay DC, Turner RJ.** Diversity and evolution of the small multidrug resistance protein family. *BMC Evol Biol.* 2009;9:140.
10. **Becker K, Heilmann C, Peters G.** Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev.* 2014 Oct;27(4):870-926.
11. **Bennett PM.** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol.* 2008 Mar;153 Suppl 1:S347-57.
12. **Bismuth R, Zilhao R, Sakamoto H, Guesdon JL, Courvalin P.** Gene heterogeneity for tetracycline resistance in *Staphylococcus spp.* *Antimicrob Agents Chemother.* 1990 Aug;34(8):1611-4.
13. **Bjorland J, Steinum T, Sunde M, Waage S, Heir E.** Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Oct;47(10):3046-52.
14. **Bouchami O, Achour W, Ben Hassen A.** Prevalence and mechanisms of macrolide resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates from neutropenic patients in Tunisia. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Jan;13(1):103-6.
15. **Bröer S, Ji G, Bröer A, Silver S.** Arsenic efflux governed by the arsenic resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J Bacteriol.* 1993 Jun;175(11):3480-5.
16. **Brown MH, Skurray RA.** Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001 Apr;3(2):163-70.
17. **Cafini F, Nguyen le TT, Higashide M, Roman F, Prieto J, Morikawa K.** Horizontal gene transmission of the *cfr* gene to MRSA and *Enterococcus*: role of *Staphylococcus epidermidis* as a reservoir and alternative pathway for the spread of linezolid resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2016 Mar;71(3):587-92.
18. **Cambray G, Guerout AM, Mazel D.** Integrons. *Annu Rev Genet.* 2010;44:141-66.
19. **Carattoli A.** 2013 Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013 Aug;303(6-7):298-304.
20. **Chapman JS.** Biocide resistance mechanisms. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 2003 Mar;51(2):133-38.

21. **Chesneau O, Ligeret H, Hosan-Aghaie N, Morvan A, Dassa E.** Molecular analysis of resistance to streptogramin A compounds conferred by the *Vga* proteins of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Mar;49(3):973-80.
22. **Chopra I, Roberts M.** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001 Jun;65(2):232-60.
23. **Chopra I.** Antibiotics. *In: Encyclopedia of Life Sciences.* 2002. John Wiley & Sons, Ltd. Chicester. www.els.net/
24. **Ciusa ML, Furi L, Knight D, Decorosi F, Fondi M, Raggi C, Coelho JR, Aragonés L, Moce L, Visa P, Freitas AT, Baldassarri L, Fani R, Viti C, Orefici G, Martínez JL, Morrissey I, Oggioni MR; BIOHYPO Consortium.** A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2012 Sep;40(3):210-20.
25. **Coculesco BI.** Antimicrobial resistance induced by genetic changes. *J Med Life.* 2009 Apr;2(2): 114–23.
26. **Cohn LA, Middleton JR.** A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2010 Feb;20(1):31-45.
27. **Costa SS, Falcão C, Viveiros M, Machado D, Martins M, Melo-Cristino J, Amaral L, Couto I.** Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol.* 2011 Oct 27;11:241.
28. **Costa SS, Palma C, Kadlec K, Feßler TA, Viveiros M, Melo-Cristino J, Schwarz S, Couto I.** Plasmid-borne antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated in a hospital in Lisbon, Portugal. *Microb Drug Resist.* 2016 Dec;22(8):617-26.
29. **Costa SS, Viveiros M, Amaral L, Couto I.** Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. *Open Microbiol J.* 2013; 7: 59–71.
- 29b. **Costa SS, Viveiros M, Pomba C, Couto I.** Active antimicrobial efflux in *Staphylococcus epidermidis*: building up of resistance to fluoroquinolones and biocides in a major opportunistic pathogen. *J Antimicrob Chemother.* Feb 1;73(2):320-324.

30. **Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999 May;284(5418):1318-22.
31. **Couto N, Belas A, Kadlec K, Schwarz S, Pomba C.** Clonal diversity, virulence patterns and antimicrobial and biocide susceptibility among human, animal and environmental MRSA in Portugal. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Sep;70(9):2483-7.
32. **Couto N, Monchique C, Belas A, Marques C, Gama LT, Pomba C.** Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated from companion animals over a 16 year period. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Jun;71(6):1479-87.
33. **Crupper SS, Veronica W, Stewart CG, Iandolo JJ.** Cloning and expression of *cadD*, a new cadmium resistance gene of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1999 Jul;181(13):4071-5.
34. **Dantas G, Sommer MOA.** How to fight back against antibiotic resistance. *Am Sci*. 2014 Feb;102(1):42-51.
35. **Davies J, Davies D.** Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 2010 Sep; 74(3); 417-33.
36. **D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD.** Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011 Aug;477(7365):457-61.
37. **Deng F, Wang H, Liao Y, Li J, Feßler AT, Michael GB, Schwarz S, Wang Y.** Detection and genetic environment of pleuromutilin-lincosamide-streptogramin A resistance genes in staphylococci isolated from pets. *Front Microbiol*. 2017 Feb;8:234.
38. **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Estocolmo:ECDC;2013.
39. **Firth N, Skurray RA.** Mobile elements in the evolution and spread of multiple-drug resistance in staphylococci. *Drug Resist Updat*. 1998 Mar;1(1):49-58.
40. **Forbes AB, Schaberg RD.** Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: evidence for conjugative exchange of resistance. *J Bacteriol*. 1983 Feb;153(2):627-34.

41. **Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A.** Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2005 Sep;3(9):722-32.
42. **Furuya EY, Lowy FD.** Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Jan;4(1):36-45.
43. **Fyfe C, Grossman TH, Kerstein K, Sutcliffe J.** Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016 Oct;6(10) pii: a025395..
44. **Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F.** The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev.* 2009 May;33(3):657-87.
45. **Gilbert P, McBain AJ.** Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Apr;16(2):189-208.
46. **Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, Paulsen IT, Kolonay JF, Brinkac L, Beanan M, Dodson RJ, Daugherty SC, Madupu R, Angiuoli SV, Durkin AS, Haft DH, Vamathevan J, Khouri H, Utterback T, Lee C, Dimitrov G, Jiang L, Qin H, Weidman J, Tran K, Kang K, Hance IR, Nelson KE, Fraser CM.** Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol.* 2005 Apr;187(7):2426-38.
47. **Gnanadhas DP, Marathe SA, Chakravorty D.** Biocides-resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin Investig Drugs.* 2013 Feb;22(2):191-206.
48. **Gomes F, Teixeira P, Oliveira R.** Mini-review: *Staphylococcus epidermidis* as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. *Biofouling.* 2014 Feb;30(2):131-41.
49. **Grandgirard D, Furi L, Ciusa ML, Baldassarri L, Knight DR, Morrissey I, Largiadèr CR, Leib SL, Oggioni MR.** Mutations upstream of *fabI* in triclosan resistant *Staphylococcus aureus* strains are associated with elevated *fabI* gene expression. *BMC Genomics.* 2015;16(1):345.

- 50. Grinius LL, Goldberg EB.** Bacterial multidrug resistance is due to a single membrane protein which functions as a drug pump. *J Biol Chem.* 1994 Nov;269(47):29998-30004.
- 51. Haroche J, Allignet J, Buchrieser C, El Solh N.** Characterization of a variant of *vga(A)* conferring resistance to streptogramin A and related compounds. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Sep;44(9):2271-5.
- 52. Hasman H, Franke S, Rensing C.** Resistance to metals used in agricultural production. *In:* Frank M. Aarestrup editor. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.* Washington, DC: American Society for Microbiology. 2006. pp. 99-114.
- 53. Hawkey PM, Jones AM.** The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep;64 Suppl 1:i3-10.
- 54. Heir E, Sundheim G, Holck AL.** The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *J Appl Microbiol.* 1999 Mar;86(3):378-88.
- 55. Heir E, Sundheim G, Holck AL.** The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 1998 Jun;163(1):49-56.
- 56. Hobman JL, Crossman LC.** Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J Med Microbiol.* 2015 May;64(Pt 5):471-97.
- 57. Ignak S, Nakipoglu Y, Gurler B.** Frequency of antiseptic resistance genes in clinical staphylococci and enterococci isolates in Turkey. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2017;6:88.
- 58. Jaglic Z, Cervinkova D.** Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds - the *qac* genes and their role: a review. *Veterinarni Medicina.* 2012;57(6): 275–81.
- 59. Jaglic Z, Michu E, Holasova M, Vlkova H, Babak V, Kolar M, Bardon J, Schlegelova J.** Epidemiology and characterization of *Staphylococcus epidermidis* isolates from humans, raw bovine milk and a dairy plant. *Epidemiol Infect.* 2010 May;138(5):772-82.

60. **Jensen LB, Garcia-Migura L, Valenzuela AJ, Løhr M, Hasman H, Aarestrup FM.** A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J Microbiol Methods*. 2010 Jan;80(1):25-43.
61. **Juárez-Verdayes AM, Parra-Ortega B, Hernández-Rodríguez C, Betanzos-Cabrera G, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz EM, Cancino-Díaz CJ.** Identification and expression of *nor* efflux family genes in *Staphylococcus epidermidis* that act against gatifloxacin. *Microb Pathog*. 2012 Jun;52(6):318-25.
62. **Juda M, Chudzik-Rzad B, Malm A.** The prevalence of genotypes that determine resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B compared with spiramycin susceptibility among erythromycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016 Mar;111(3):155-60.
63. **Jutkina J, Marathe NP, Flach CF, Larsson DGJ.** Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Sci Total Environ*. 2018 Mar;616-617:172-8.
64. **Kadlec K, Pomba CF, Couto N, Schwarz S.** Small plasmids carrying *vga(A)* or *vga(C)* genes mediate resistance to lincosamides, pleuromutilins and streptogramin A antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from swine. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Dec;65(12):2692-3.
65. **Kadlec K, Schwarz S.** Novel ABC transporter gene, *vga(C)*, located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 Strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Aug;53(8):3589-91.
66. **Khan SA, Novick RP.** Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*. 1983 Nov;10(3):251-9.
67. **Kloos WE, Schleifer KH.** Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol*. 1975 Jan;1(1):82-8.
68. **Kos V, Ford RC.** The ATP-binding cassette family: a structural perspective. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Oct;66(19):3111-26.
69. **Kraemer GR, Iandolo JJ.** High-frequency transformation of *Staphylococcus aureus* by electroporation. 1990 Dec;21(6):373-6
70. **Kuroda T, Tsuchiya T.** Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim Biophys Acta*. 2009 May;1794(5):763-8.

71. **Laguerre G, Mazurier SI, Amarger N.** Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. FEMS Microbiol. Lett. 1992;101:17–26.
72. **Langton KP, Henderson PJ, Herbert RB.** Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism? Nat Prod Rep. 2005 Aug;22(4):439-51.
73. **Lanza VF, Tedim AP, Martínez JL, Baquero F, Coque TM.** The plasmidome of *Firmicutes*: impact on the emergence and the spread of resistance to antimicrobials. Microbiol Spectr. 2015 Apr;3(2):PLAS-0039-2014.
74. **Le Bouter A, Leclercq R, Cattoir V.** Molecular basis of resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Staphylococcus saprophyticus* clinical isolates. Int J Antimicrob Agents. 2011 Feb;37(2):118-23.
75. **Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ.** Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. Nat Rev Microbiol. 2013 Jun;11(6):371-84.
76. **Levy BS, Clowes RC, Koenig EL.** Arsenate, arsenite and antimony (III) resistances. In: Stuart B Levy editor. Molecular biology, pathogenicity, and ecology of bacterial plasmids. Springer Science+Business Media, New York; originally published by Plenum Press New York and London. 1981. pp 184.
77. **Lindsay JA, Holden MT.** Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. Funct Integr Genomics. 2006 Jul;6(3):186-201.
78. **Lozano C, Aspiroz C, Rezusta A, Gómez-Sanza E, Simon C, Gómez P, Ortega C, Revillo MJ, Zarazaga M, Torres C.** Identification of novel *vga(A)*-carrying plasmids and a Tn5406-like transposon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* of human and animal origin. Int J Antimicrob Agents. 2012 Oct;40(4):306-12.
79. **Maillard JY.** Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: Should it be of genuine concern? J Hosp Infect. 2007 Jun;65(2):60-72
80. **Malachowa N, DeLeo FR.** Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. Cell Mol Life Sci. 2010 Sep; 67(18): 3057–71.
81. **Martínez JL.** Effect of antibiotics on bacterial populations: a multi-hierarchical selection process. F1000Research. 2017;6:51.

- 82. Massidda O, Mingoia M, Fadda D, Whalen MB, Montanari MP, Varaldo PE.** Analysis of the beta-lactamase plasmid of borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: focus on *bla* complex genes and cadmium resistance determinants *cadD* and *cadX*. *Plasmid*. 2006 Mar;55(2):114-27.
- 83. McCarthy AJ, Lindsay JA.** The distribution of plasmids that carry virulence and resistance genes in *Staphylococcus aureus* is lineage associated. *BMC Microbiol*. 2012 Jun 12;12:104.
- 84. McDonnell G, Russel AD.** Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Jan;12(1):147-79.
- 85. Nair D, Memmi G, Francois P, Cheung LA.** Whole genome sequencing of *Staphylococcus aureus* strain RN4220, a key laboratory strain used in virulence research, identifies mutations that affect not only virulence factors but also the fitness of the strain. *J Bacteriol*. 2011 May;193(9):2332-5.
- 86. Nair R, Thapaliya D, Su Y, Smith TC.** Resistance to zinc and cadmium in *Staphylococcus aureus* of human and animal origins. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014 Oct;35 Suppl 3:S32-9.
- 87. Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiarian S, Arezi S, Hosseini M, Baravati SZ, Jokar Z, Chermahin SG.** Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hyg Infect Control*. 2014 Sep;9(3):Doc23.
- 88. Nikaido H.** Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 2011;77:1-60.
- 89. Novick RP.** Genetic systems in staphylococci. *Methods Enzymol*. 1991;204:587-636.
- 90. Novick RP.** Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu Rev Microbiol*. 1989;43:537-65.
- 91. Novotna G, Adamkova V, Janata J, Melter O, Spizek J.** Prevalence of resistance mechanisms against macrolides and lincosamides in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the Czech Republic and occurrence of an undefined mechanism of resistance to lincosamides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Aug;49(8):3586-9.
- 92. Novotna G, Janata J.** A new evolutionary variant of the streptogramin A resistance protein, *Vga(A)_{LC}*, from *Staphylococcus haemolyticus* with shifted substrate

- specificity towards lincosamides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006 Dec;50(12): 4070-6.
93. **Nucifora G, Chu L, Misra TK, Silver S.** Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 May; 86(10): 3544–48.
 94. **O'Neill AJ, McLaws F, Kahlmeter G, Henriksen AS, Chopra I.** Genetic Basis of Resistance to Fusidic Acid in *Staphylococci*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 May; 51(5): 1737–1740.
 95. **Oger C, Mahillon J, Petit F.** Distribution and diversity of a cadmium resistance (*cadA*) determinant and occurrence of IS257 insertion sequences in staphylococcal bacteria isolated from a contaminated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol.* 2003 Mar 1;43(2):173-83.
 96. **Olsen JE, Christensen H, Aarestrup FM.** Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Mar;57(3):450-60.
 97. **Onni T, Sanna G, Larsen J, Tola S.** Antimicrobial susceptibilities and population structure of *Staphylococcus epidermidis* associated with ovine mastitis. *Vet Microbiol.* 2011 Feb;148(1):45-50.
 98. **Orlek A, Stoesser N, Anjum MF, Doumith M, Ellington MJ, Peto T, Crook D, Woodford N, Walker AS, Phan H, Sheppard AE.** Plasmid classification in an era of whole-genome sequencing: Application in studies of antibiotic resistance epidemiology. *Front Microbiol.* 2017 Feb;8:182.
 99. **Ortega Morente E, Fernández-Fuentes MA, Grande Burgos MJ, Abriouel H, Pérez Pulido R, Gálvez A.** Biocide tolerance in bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2013 Mar 1;162(1):13-25.
 100. **Otto M.** Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol.* 2012 Mar;34(2):201-14.
 101. **Otto M.** *Staphylococcus epidermidis* – the ‘accidental pathogen’. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Aug;7(8):555-67.
 102. **Oz T, Guvenek A, Yildiz S, Karaboga E, Tamer YT, Mumcuyan N, Ozan VB, Senturk GH, Cokol M, Yeh P, Toprak E.** Strength of selection pressure is an

- important parameter contributing to the complexity of antibiotic resistance evolution. *Mol Biol Evol.* 2014 Sep;31(9):2387-401.
- 103.Pao SS, Paulsen IT, Saier MH.** Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Mar;62(1):1-34.
- 104.Paulsen IT, Brown MH, Littlejohn TG, Mitchell BA, Skurray RA.** Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 16; 93(8): 3630–35.
- 105.Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA.** Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev.* 1996;60(4):575-608.
- 106.Piddock LJ.** Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Apr;19(2):382-402.
- 107.Piddock LJ.** Multidrug-resistance efflux pumps — not just for resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2006 Aug;4(8):629-36.
- 108.Poole K.** Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jul;56(1):20-51.
- 109.Poole K.** Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol.* 2002;92 Suppl:55S-64S.
- 110.Prag G, Falk-Brynhildsen K, Jacobsson S, Hellmark B, Unemo M, Soderquist B.** Decreased susceptibility to chlorhexidine and prevalence of disinfectant resistance genes among clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *APMIS.* 2014 Oct;122(10):961-7.
- 111.Putman M, van Veen HW, Konings WN.** Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000 Dec;64(4):672-93.
- 112.Qin X, Poon B, Kwong J, Niles D, Schmidt BZ, Rajagopal L, Gantt S.** Two paediatric cases of skin and soft-tissue infections due to clindamycin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a plasmid-encoded *vga(A)* allelic variant for a putative efflux pump. *Int J Antimicrob Agents.* 2011 Jul;38(1):81-3.
- 113.Rensing C, Ghosh M, Rosen BP.** Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol.* 1999 Oct;181(19):5891-7.

- 114.**Reynolds E, Ross JL, Cove JH.** Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *Int J Antimicrob Agents*. 2003 Sep;22(3):228-36.
- 115.**Roberts MC.** Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev*. 1996 Oct;19(1):1-24.
- 116.**Rodrigues AC.** Colonização nasal por staphylococci meticilina- resistente em portadores humanos saudáveis em contacto diário com animais: frequência e estudo seguimento [MSc Thesis]. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa, 2015.
- 117.**Rodrigues AC, Belas A, Marques C, Cruz L, Gama LT, Pomba C.** Risk factors for nasal colonization by methicillin-resistant staphylococci in healthy humans in professional daily contact with companion animals in Portugal. *Microb Drug Resist*. 2017 Sep. [Epub ahead of print]
- 118.**Rogers KL, Fey PD, Rupp ME.** Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2009 Mar;23(1):73-98.
- 119.**Romero JL, Grande Burgos MJ, Pérez-Pulido R, Gálvez A, Lucas R.** Resistance to antibiotics, biocides, preservatives and metals in bacteria isolated from seafoods: co-selection of strains resistant or tolerant to different classes of compounds. *Front Microbiol*. 2017; 8: 1650.
- 120.**Rosa M.** Contribuição do efluxo para a resistência a compostos antimicrobianos em *Staphylococcus epidermidis*. [MSc Thesis]. Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas. Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa, 2017.
- 121.**Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ, Baumberg S, Wootton JC.** Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol*. 1990 Jul;4(7):1207-14.
- 122.**Russel AD.** Plasmids and bacterial resistance to biocides. *J Appl Microbiol*. 1997 Aug;83(2):155-65.
- 123.**SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks).** Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. 2009. Bruxelas, Bélgica.

124. **Schmitz F-J, Jones ME, Hofmann B, Hansen B, Scheuring S, Lückefahr M, Fluit A, Verhoef J, Hadding U, Heinz H-P, Köhrer K.** Characterization of *grlA*, *grlB*, *gyrA*, and *gyrB* mutations in 116 unrelated isolates of *Staphylococcus aureus* and effects of mutations on ciprofloxacin MIC. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 May;42(5):1249-52.
125. **Schwarz CS, Cardoso M, Blobel H.** Plasmid-mediated chloramphenicol resistance in *Staphylococcus hyicus*. *J. Gen Microbiol.* 1989;135:3329-36.
126. **Schwarz S, Cardoso M, Wegener HC.** Nucleotide sequence and phylogeny of the *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:580–8.
127. **Schwarz S, Feßler AT, Hauschild T, Kehrenberg C, Kadlec K.** Plasmid-mediated resistance to protein biosynthesis inhibitors in staphylococci. *Ann N Y Acad Sci.* 2011 Dec;1241:82-103.
128. **Schwarz S, Grogory ID, Werckenthin C, Curnock S, Dyke KG.** A novel plasmid from *Staphylococcus epidermidis* specifying resistance to kanamycin, neomycin and tetracycline. *J Med Microbiol.* 1996 Jul;45(1):57-63.
129. **Schwarz S, Noble WC.** Tetracycline resistance genes in staphylococci from the skin of pigs. *J Appl Bacteriol* 1994;76:320–6.
130. **Schwarz S, Roberts MC, Werckenthina C, Pang Y, Langea C.** Tetracycline resistance in *Staphylococcus spp.* from domestic animals. *Vet Microbiol.* 1998 Oct;63(2-4):217-27.
131. **Schwarz S, Shen J, Wendlandt S, Fessler AT, Wang Y, Kadlec K, Wu CM.** Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Staphylococci* and other *Firmicutes*. *Microbiol Spectr.* 2014 Dec;2(6).
132. **Shahsavan S, Emameini M, Noorazar Khoshnab B, Khoramian B, Asadollahi P, Aligholi M, Jabalameli F, Eslampour MA, Taherikalani M.** A high prevalence of mupirocin and macrolide resistance determinant among *Staphylococcus aureus* strains isolated from burnt patients. *Burns.* 2012 May;38(3):378-82.
133. **Shearer JES, Wireman J, Hostetler J, Forberger H, Borman J, Gill J, Sanchez S, Mankin A, LaMarre J, Lindsay AJ, Bayles K, Nicholson A, O'Brien F, Jensen OS, Firth N, Skurray AR, Summers OA.** Major families of multiresistant

- plasmids from geographically and epidemiologically diverse staphylococci. G3 (Bethesda). 2011 Dec; 1(7): 581–91.
134. **Shi GS, Boost M, Cho P.** Prevalence of antiseptic-resistance genes in staphylococci isolated from orthokeratology lens and spectacle wearers in Hong Kong. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015 May;56(5):3069-74.
 135. **Silver S, Phung le T, Silver G.** Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. J Ind Microbiol Biotechnol. 2006 Jul;33(7):627-34.
 136. **Skovgaard S, Larsen MH, Nielsen LN, Skov RL, Wong C, Westh H, Ingmer H.** Recently introduced *qacA/B* genes in *Staphylococcus epidermidis* do not increase chlorhexidine MIC/MBC. J Antimicrob Chemother. 2013 Oct;68(10):2226-33.
 137. **Slifierz MJ, Park J, Friendship RM, Weese JS.** Zinc-resistance gene *czrC* identified in methicillin-resistant *Staphylococcus hyicus* isolated from pigs with exudative epidermitis. Canad Vet J. 2014;55(5):489-90.
 138. **Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F.** Mobility of plasmids. Microbiol Mol Biol Rev. 2010 Sep;74(3):434-52.
 139. **Svara F, Rankin JD.** The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance. BMC Evol Biol. 2011 May;11: 130.
 140. **Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright DG.** The tetracycline resistome. Cell Mol Life Sci. 2010 Feb;67(3):419-31.
 141. **Thorberg BM, Kühn I, Aarestrup FM, Brändström B, Jonsson P, Danielsson-Tham ML.** Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. Vet Microbiol. 2006 Jun;115(1-3):163-72.
 142. **Treangen TJ, Maybank RA, Enke S, Friss MB, Diviak LF, Karaolis DK, Koren S, Ondov B, Phillippy AM, Bergman NH, Rosovitz MJ.** Complete genome sequence of the quality control strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. Genome Announc. 2014 Nov-Dec; 2(6): e01110-14.
 143. **Udo EE, Grubb WB.** A new incompatibility group plasmid in *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol Lett. 1991;78(1): 33–6.
 144. **United Nations (UN).** Political declaration of the high- level meeting of the General Assembly on antimicrobial resistance. Sustaining global action on antimicrobial resistance. Oct. 2016. Doc. A/RES/71/3. Nova Iorque, EUA.

145. **Vali L, Davies SE, Lail LL, Dave J, Amyes SG.** Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J Antimicrob Chemother. 2008 Mar;61(3):524-32.
146. **Ventola CL.** The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats. P T. 2015 Apr; 40(4): 277–83.
147. **Wendlandt S, Shen J, Kadlec K, Wang Y, Li B, Zhang WJ, Feßler AT, Wu C, Schwarz S.** Multidrug resistance genes in staphylococci from animals that confer resistance to critically and highly important antimicrobial agents in human medicine. Trends Microbiol. 2015 Jan;23(1):44-54.
148. **Wendlandt S, Kadlec K, Feßler AT, Schwarz S.** Identification of ABC transporter genes conferring combined pleuromutilin lincosamide–streptogramin A resistance in bovine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. Vet Microbiol. 2015 Jun;177(3-4):353-8.
149. **White DG, McDermott PF.** Biocides, drug resistance and microbial evolution. Curr Opin Microbiol. 2001 Jun;4(3):313-7.
150. **World Health Organization (WHO).** Global Action Plan on antimicrobial Resistance. Geneva, Suíça:WHO;2015.
151. **Zhang YQ, Ren SX, Li HL, Wang YX, Fu G, Yang J, Qin ZQ, Miao YG, Wang WY, Chen RS, Shen Y, Chen Z, Yuan ZH, Zhao GP, Qu D, Danchin A, Wen YM.** Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). Mol Microbiol. 2003 Sep;49(6):1577-93.
152. **Zhu W, Murray PR, Huskins WC, Jernigan JA, McDonald LC, Clark NC, Anderson KF, McDougal LK, Hageman JC, Olsen-Rasmussen M, Frace M, Alangaden GJ, Chenoweth C, Zervos MJ, Robinson-Dunn B, Schreckenberger PC, Reller LB, Rudrik JT, Patel JB.** Dissemination of an *Enterococcus* Inc18-Like *vanA* plasmid associated with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Oct;54(10):4314-20.

ANEXOS

ANEXO I

Perfis plasmídicos e determinantes plasmídicos que codificam para bombas de efluxo presentes nos isolados de *S. epidermidis* de colonização humana.

Tabela A1. Perfis plasmídicos e determinantes plasmídicos que codificam para bombas de efluxo presentes nos isolados de *S. epidermidis* de colonização humana.

Isolado	Plasmídeos			Corantes e Biocidas								Metais pesados					Antibióticos				
	Nº de plasmídeos	Tamanho aproximado (kb)	Tamanho através restrição (kb)	CMI ¹ EtBr (mg/L)	CW ¹ [EtBr] (mg/L)	CMI ¹ BAC (mg/L)	CMI ¹ PT (mg/L)	<i>qacA/B</i> ¹	<i>smu</i> ¹	<i>qacG</i>	<i>qacJ</i>	CMI ¹ Ars (mM)	<i>arsB</i>	CMI ¹ Cd (mM)	<i>cadA</i>	<i>cadD</i>	Fenótipo de Resistência Antibióticos ¹	<i>msrA</i>	<i>tet(K)</i>	<i>vga(A)</i>	<i>vga(C)</i>
FMV-22	2	≥23 + <3	26,52+1,68	0,5	0,25	1	16				ND	16	ND	0,015			FOX, GEN, TOB, FUS	ND	ND	ND	ND
FMV-23	1	≥23	33,7	64	> 2,5	2	128					4	ND	0,015			FOX, TET , FUS	ND		ND	ND
FMV-24	1	<3	1,73	1	0,25	0,5	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			FOX, CIP, NOR, MXF	ND	ND	ND	ND
FMV-25	1	≥23	20,86	2	0,25	0,5	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			FOX, ERY , TOB, TET , FUS			ND	ND
FMV-26	2	≥23 + ~10	-	0,5	0,25	0,5	16			ND	ND	16	ND	< 0,008			---	ND	ND	ND	ND
FMV-27	1	~10	10	32	> 2,5	2	64					8	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , NOR, GEN, TOB, TET , FUS				
FMV-28	3	≥23 + ~10 + <3	-	64	> 2,5	4	128					16	ND	0,015			FOX, TOB, FUS	ND	ND	ND	ND
FMV-29	3	≥23 + ~10 + <3	-	32	1,5	2	16					16	ND	0,015			---	ND	ND	ND	ND
FMV-30	1	≥23	31,28	0,5	0,25	1	32			ND	ND	16	ND	< 0,008			FOX, RIF	ND	ND	ND	ND
FMV-31	2	≥23 + <3	32,51 + 1,85	32	2,5	4	128					16	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , CIP, NOR		ND		
FMV-32	3	≥23 + ~10 + <3	-	2	0,25	1	16			ND	ND	16	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , FUS		ND		
FMV-33	2	<3 + <3	3,47 + 1,08	32	> 1,5	4	64					16	ND	0,015			FOX, ERY , CLi , NOR, CIP, GEN, TOB, TET , FUS				
FMV-34	2	≥23 + ~10		2	0,25	0,5	16			ND	ND	1	ND	0,015			FOX, ERY , TOB, TET , FUS			ND	ND
FMV-35	1	~10	14,56	2	0,25	1	16			ND	ND	0,5	ND	0,015			ERY , FUS		ND	ND	ND
FMV-36	1	≥23	18,67	1	0,25	0,5	16			ND	ND	32	ND	< 0,008			ERY		ND	ND	ND
FMV-37	2	≥23 + ~10	-	1	0,25	0,5	16			ND	ND	8	ND	0,015			ERY		ND	ND	ND
FMV-38	>3	≥23+ ~10 + ~10 + <3	-	0,5	0,5	0,5	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			ERY , FUS		ND	ND	ND
FMV-39	2	≥23 + <3	17,04 + 1,63	1	0,5	0,5	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			ERY , FUS		ND	ND	ND
FMV-40	1	<3	1,58	0,5	0,5	0,5	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			FUS	ND	ND	ND	ND
FMV-41	1	~10	15,83	0,5	0,25	0,5	16			ND	ND	16	ND	0,015			FUS	ND	ND	ND	ND
FMV-42	1	≥23	23,35	2	0,25	1	16			ND	ND	0,5	ND	0,25			FOX, ERY , TET , FUS			ND	ND
FMV-45	3	≥23 + ~10 + <3	-	1	0,5	0,5	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			ERY , CLi		ND		
FMV-46	1	≥23	28,56	128	> 1,5	4	128					16	ND	0,03			FOX, MUP	ND	ND	ND	ND
FMV-47	2	≥23 + ~10	(23) e 8,72	64	2	4	64					8	ND	0,015			ERY , FUS		ND	ND	ND
FMV-48	1	≥23	18,43	0,5	0,25	0,5	16			ND	ND	2	ND	< 0,008			---	ND	ND	ND	ND
FMV-49	3	≥23 + ~10 + <3	-	0,5	0,5	0,5	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			ERY , FUS		ND	ND	ND
FMV-50	>3	≥23+~10 + ~10 + <3	-	4	0,5	1	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			ERY		ND	ND	ND

Negativo

Positivo

CMI: Concentração mínima inibitória; **CW**: Ensaio de Cartwheel; **-**: Tamanho não determinado; **--**: Susceptível; **ND**: Não determinado; **EtBr**: brometo de etídio; **BAC**: cloreto de benzalcônio; **PT**: pentamidina; **Ars**: arsenato; **Cd**: cádmio; **FOX**: cefoxitina **ERY**: eritromicina; **CLi**: clindamicina; **CLi**: Resistência indutível à clindamicina; **CIP**: ciprofloxacina; **NOR**: norfloxacina; **GEN**: gentamicina; **TOB**: tobramicina; **TET**: tetraciclina; **FUS**: ácido fusídico; **MXF**: moxifloxacina; **MUP**: mupirocina; **RIF**: rifampicina; **1**- Resultados obtidos em estudos anteriores ([120]; Costa *et al* dados ainda não publicados); **Negrito (ex. TET, ERY)** - Antibióticos estudados no presente trabalho.

Tabela A1. (continuação)

Isolado	Plasmídeos			Corantes e Biocidas								Metais pesados					Antibióticos				
	Nº de plasmídeos	Tamanho aproximado (kb)	Tamanho através restrição (kb)	CMI ¹ EtBr (mg/L)	CW ¹ [EtBr] (mg/L)	CMI ¹ BAC (mg/L)	CMI ¹ PT (mg/L)	<i>qacA/B</i> ¹	<i>smr</i> ¹	<i>qacG</i>	<i>qacJ</i>	CMI ¹ Ars (mM)	<i>arsB</i>	CMI ¹ Cd (mM)	<i>cadA</i>	<i>cadD</i>	Fenótipo de Resistência Antibióticos ¹	<i>msrA</i>	<i>tet(K)</i>	<i>vga(A)</i>	<i>vga(C)</i>
FMV-51	2	≥23 + <3	-	1	0,25	0,5	16			ND	ND	16	ND	0,015			FOX, ERY , CLi , FUS		ND		
FMV-52	3	≥23 + ~10 + <3	-	32	> 1,5	4	16					16	ND	< 0,008			FOX, CIP, NOR	ND	ND	ND	ND
FMV-53	3	≥23 + ~10 + <3	-	16	> 1,5	4	16					16	ND	0,015			FOX, CIP, NOR, MXF, FUS	ND	ND	ND	ND
FMV-54	1	≥23	45,45	16	> 1,5	1	64					8	ND	< 0,008			TET	ND		ND	ND
FMV-55	2	≥23 + <3	-	1	0,5	0,25	16			ND	ND	> 32	ND	< 0,008			---	ND	ND	ND	ND
FMV-57	3	≥23 + ~10 + <3	-	1	0,25	0,5	16			ND	ND	16	ND	0,015			FOX, ERY , TET			ND	ND
FMV-58	1	≥23	25,2	2	0,5	1	16			ND	ND	16	ND	< 0,008			FOX, ERY , FUS		ND	ND	ND
FMV-59	>3	≥23 + ≥23 + ~10 + <3	-	2	0,25	1	32			ND	ND	8	ND	< 0,008			ERY , CLi , TET				
FMV-60	1	≥23	41,25	128	> 1,5	4	128					> 32	ND	< 0,008			FOX, TOB, FUS	ND	ND	ND	ND
FMV-61	1	~10	9,439	0,5	0,25	0,5	16			ND	ND	> 32	ND	< 0,008			FOX, SXT, W	ND	ND	ND	ND
FMV-62	1	≥23	-	32	> 1,5	2	64					16	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , CIP, NOR, GEN, TOB, TET , FUS				
FMV-63	1	≥23	-	32	> 1,5	2	64					16	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , CIP, NOR, GEN, TOB, TET , FUS				
FMV-64	3	≥23 + ~10 + <3	-	1	0,25	0,25	32			ND	ND	8	ND	< 0,008			FOX, FUS	ND	ND	ND	ND
FMV-65	3	≥23 + <3 + <3	-	0,5	0,25	0,5	8			ND	ND	16	ND	0,015			ERY		ND	ND	ND
FMV-66	3	≥23 + ~10 + <3	-	1	0,5	1	32			ND	ND	16	ND	< 0,008			FOX, CIP, NOR, MXF	ND	ND	ND	ND
FMV-67	2	≥23 + <3	21,68 + 1,64	16	> 1,5	4	16					8	ND	0,015			FOX, ERY , CLi , NOR		ND		
FMV-68	3	≥23 + ~10 + <3	-	0,5	0,25	0,5	32			ND	ND	8	ND	< 0,008			FOX, GEN, TOB	ND	ND	ND	ND
FMV-69	3	≥23 + ~10 + <3	-	1	0,5	1	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			---	ND	ND	ND	ND
FMV-70	3	≥23 + ~10 + <3	-	4	0,5	1	16			ND	ND	8	ND	0,015			ERY , CLi , TOB		ND		
FMV-71	2	≥23 + <3	-	0,5	0,25	0,5	16			ND	ND	8	ND	0,015			FOX, CIP, NOR	ND	ND	ND	ND
FMV-72	3	≥23 + ~10 + <3	-	0,25	0,25	0,5	8			ND	ND	16	ND	< 0,008			CLi		ND		
FMV-73	1	~10	10	1	0,25	1	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			---	ND	ND	ND	ND
FMV-74	1	≥23	24,93	2	0,25	0,5	16			ND	ND	8	ND	0,015			FOX, ERY , CLi , TET , FUS, RIF				
FMV-75	2	~10 + <3	10 + 1,73	0,5	0,25	0,5	32			ND	ND	16	ND	< 0,008			FOX, FUS, RIF	ND	ND	ND	ND
FMV-76	1	≥23	31,07	4	0,25	0,5	16			ND	ND	32	ND	0,125			ERY		ND	ND	ND
FMV-77	2	≥23 + <3	21,08 + 1,95	128	> 1,5	4	128					8	ND	< 0,008			ERY , CLi , FUS		ND		
FMV-78	1	~10	10	1	0,25	1	1			ND	ND	>32	ND	0,015			FOX, CLi		ND		
FMV-79	3	≥23 + ~10 + <3	-	4	1,5	2	16					16	ND	< 0,008			FOX, GEN, TOB, TET	ND		ND	ND

Negativo

Positivo

CMI:Concentração mínima inibitória; **CW**: Ensaio de Cartwheel; **-:** Tamanho não determinado; **--:** Susceptível; **ND**: Não determinado; **EtBr**: brometo de etídio; **BAC**: cloreto de benzalcônio; **PT**: pentamidina; **Ars**: arsenato; **Cd**: cádmio; **FOX**: cefoxitina **ERY**: eritromicina; **CLi**: clindamicina; **CLi**: Resistência indutível à clindamicina; **CIP**: ciprofloxacina; **NOR**: norfloxacina; **GEN**: gentamicina; **TOB**: tobramicina; **TET**: tetraciclina; **FUS**: ácido fusídico; **MXF**: moxifloxacina; **W**: trimetoprim; **RIF**: rifampicina; **SXT**: trimetoprim-sulfametoxazol; **1-** Resultados obtidos em estudos anteriores ([120]; Costa *et al* dados ainda não publicados); **Negrito (ex. TET, ERY)**- Antibióticos estudados no presente trabalho.

Tabela A1. (continuação)

Isolado	Plasmídeos			Corantes e Biocidas								Metais pesados					Antibióticos				
	Nº de plasmídeos	Tamanho aproximado (kb)	Tamanho através restrição (kb)	CMI ¹ EtBr (mg/L)	CW ¹ [EtBr] (mg/L)	CMI ¹ BAC (mg/L)	CMI ¹ PT (mg/L)	<i>qacA/B</i> ¹	<i>smr</i> ¹	<i>qacG</i>	<i>qacJ</i>	CMI ¹ Ars (mM)	<i>arsB</i>	CMI ¹ Cd (mM)	<i>cadA</i>	<i>cadD</i>	Fenótipo de Resistência Antibióticos ¹	<i>msrA</i>	<i>tet(K)</i>	<i>vga(A)</i>	<i>vga(C)</i>
FMV-80	2	~10 + <3	12,19 + 1,79	1	0,25	0,5	16			ND	ND	4	ND	< 0,008			FOX, CLI , FUS		ND		
FMV-81	2	≥23 + ~10	-	2	0,25	0,5	16			ND	ND	0,25	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLI , TOB, TET , FUS				
FMV-82	3	≥23 + ≥23 + ~10	-	8	0,5	2	32					16	ND	< 0,008			FUS	ND	ND	ND	ND
FMV-83	3	≥23 + ~10 + <3	-	32	1,5	4	16					16	ND	< 0,008			FOX, CLI , CIP, NOR, MXF		ND		
FMV-84	1	≥23	26,91	1	0,5	0,5	16			ND	ND	16	ND	0,015			FOX, ERY , TET , FUS			ND	ND
FMV-85	3	≥23 + ~10 + <3	-	0,5	0,5	0,5	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			---	ND	ND	ND	ND
FMV-86	3	≥23 + ~10 + <3	-	0,5	0,5	0,5	16			ND	ND	16	ND	< 0,008			---	ND	ND	ND	ND
FMV-87	1	≥23	-	32	> 1,5	2	128					32	ND	0,5			FOX, CIP, NOR, MXF, GEN, TOB, SXT, W, FUS	ND	ND	ND	ND
FMV-88	1	≥23	44,75	32	> 1,5	2	128					>32	ND	0,015			FOX, ERY , CLi , NOR, MXF, GEN, TET , FUS				
FMV-89	2	≥23 + <3	-	0,5	0,5	0,25	8			ND	ND	16	ND	< 0,008			---	ND	ND	ND	ND
FMV-90	3	≥23 + ~10 + <3	-	0,5	0,5	0,25	32			ND	ND	> 32	ND	< 0,008			FOX	ND	ND	ND	ND
FMV-91	2	≥23 + ~10	-	64	> 1,5	2	64	<i>qacB+</i>				2	ND	0,06			FOX, ERY , CLi		ND		
FMV-92	>3	≥23+~10 + ~10 + <3	-	2	0,5	2	16			ND	ND	> 32	ND	< 0,008			---	ND	ND	ND	ND
FMV-93	1	≥23	37	64	> 1,5	2	64					8	ND	0,03			FOX, ERY , CLi , CIP, NOR, MXF		ND		
FMV-94	3	≥23 + ~10 + <3	-	2	0,5	0,5	16			ND	ND	16	ND	0,03			FOX, ERY , CLi , TOB, TET , FUS				
FMV-96	>3	≥23 + ~10 + <3+ <3	-	1	0,5	0,25	16			ND	ND	16	ND	0,015			FOX, ERY , CIP, NOR, MXF, FUS		ND	ND	ND
FMV-97	2	~10 + <3	8,89 + 1,61	128	1,5	4	128					8	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , CIP, NOR, GEN, TOB, TET , FUS				
FMV-98	3	≥23 + ~10 + <3	-	0,5	0,5	0,5	4			ND	ND	4	ND	0,015			---	ND	ND	ND	ND
FMV-99	1	≥23	35,77	0,5	0,25	1	16			ND	ND	16	ND	0,015			FOX, CIP, NOR, MXF	ND	ND	ND	ND
FMV-100	>3	≥23 + ~10 + <3	-	0,25	0,5	0,5	8			ND	ND	> 32	ND	0,015			ERY , CLI , FUS		ND		
FMV-101	1	≥23	-	32	1	2	64					8	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , CIP, NOR, GEN, TOB, TET , FUS				
FMV-102	3	≥23 + ~10 + <3	-	64	> 1,5	4	128					> 32	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , GEN, TOB, FUS		ND		
FMV-103	2	≥23 + ~10	-	128	> 1,5	4	128					>32	ND	0,125			FOX, TOB, FUS, RIF	ND	ND	ND	ND
FMV-104	3	≥23 + ~10 + <3	-	128	> 1,5	4	128					16	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , CIP, NOR, MXF, GEN, TOB, TET , SXT, W, FUS				
FMV-105	3	≥23 + ~10 + <3	-	0,5	0,25	0,5	16			ND	ND	16	ND	0,015			---	ND	ND	ND	ND
FMV-106	3	≥23+ ~10 + <3	-	32	0,75	1	64					8	ND	0,03			ERY		ND	ND	ND
FMV-107	2	≥23 + ~10	-	64	1,5	1	128					32	ND	0,03			W	ND	ND	ND	ND
FMV-108	3	≥23 + <3 + <3	-	0,5	0,25	0,25	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			---	ND	ND	ND	ND

Negativo

Positivo

CMI:Concentração mínima inibitória; **CW:** Ensaio de Cartwheel; **-:** Tamanho não determinado **--:** Susceptível; ND: Não determinado; EtBr: brometo de etídio; BAC: cloreto de benzalcônio; PT: pentamidina; Ars: arsenato; Cd: cádmio; FOX: cefoxitina ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; CLi: Resistência indutível à clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; TET: tetraciclina; FUS: ácido fusídico; MXF: moxifloxacina; W: trimetoprim; RIF: rifampicina; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; **1-** Resultados obtidos em estudos anteriores ([120]; Costa *et al* dados ainda não publicados); **Negrito (ex. TET, ERY)-** Antibióticos estudados no presente trabalho.

Tabela A1. (continuação)

Plasmídeos				Corantes e Biocidas								Metais pesados					Antibióticos				
Isolado	Nº de plasmídeos	Tamanho aproximado (kb)	Tamanho através restrição (kb)	CMI ¹ EtBr (mg/L)	CW ¹ [EtBr] (mg/L)	CMI ¹ BAC (mg/L)	CMI ¹ PT (mg/L)	<i>qacA/B</i> ¹	<i>smr</i> ¹	<i>qacG</i>	<i>qacJ</i>	CMI ¹ Ars (mM)	<i>arsB</i>	CMI ¹ Cd (mM)	<i>cadA</i>	<i>cadD</i>	Fenótipo de Resistência Antibiótica ¹	<i>msrA</i>	<i>tet(K)</i>	<i>vga(A)</i>	<i>vga(C)</i>
FMV-109	1	≥23	-	1	0,5	0,5	16			ND	ND	16	ND	0,015			FOX, ERY , CLi , TOB		ND		
FMV-110	1	≥23	-	2	0,5	1	16			ND	ND	16	ND	< 0,008			ERY , CLI		ND		
FMV-111	3	≥23 + ~10 + <3	-	0,5	0,25	0,5	8			ND	ND	4	ND	< 0,008			ERY , CLI		ND		
FMV-112	2	≥23 + <3	-	1	0,5	1	16			ND	ND	16	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , FUS		ND		
FMV-113	2	≥23 + <3	23,12 + 1,27	0,5	0,25	0,5	8			ND	ND	4	ND	< 0,008			ERY		ND	ND	ND
FMV-114	3	≥23 + <3 + <3	-	1	0,5	0,5	16			ND	ND	16	ND	0,03			FOX, GEN, TOB	ND	ND	ND	ND
FMV-115	1	≥23	48,35	64	1	2	64					8	ND	< 0,008			FOX, ERY , TOB, FUS		ND	ND	ND
FMV-116	1	≥23	29,5	128	> 1,5	4	128					8	ND	0,015			ERY , TOB		ND	ND	ND
FMV-117	1	≥23	29,23	0,5	0,25	0,5	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			ERY		ND	ND	ND
FMV-118	1	≥23	30,75	64	1	2	64					16	ND	< 0,008			FOX, TET	ND		ND	ND
FMV-119	2	≥23 + <3	25,49 + 1,77	0,5	0,25	0,5	16			ND	ND	32	ND	< 0,008			---	ND	ND	ND	ND
FMV-120	3	≥23 + ~10 + <3	-	64	1	4	64					>32	ND	< 0,008			FOX	ND	ND	ND	ND
FMV-121	2	≥23 + ~10	-	0,5	0,25	0,5	16			ND	ND	16	ND	0,015			FOX, CIP, NOR, MXF, TET , FUS	ND		ND	ND
FMV-122	2	≥23 + <3	26,59 e 1,81	32	0,75	2	64					32	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLI , CIP, NOR		ND		
FMV-123	2	≥23 + ~10	-	1	0,25	0,5	16			ND	ND	32	ND	< 0,008			FOX, CHL	ND	ND	ND	ND
FMV-124	1	≥23	26	16	0,5	2	16					8	ND	0,015			ERY		ND	ND	ND
FMV-125	3	≥23 + ~10 + <3	-	16	0,75	4	16					16	ND	< 0,008			FOX, CIP, NOR	ND	ND	ND	ND
FMV-126	3	≥23 + ~10 + <3	-	64	1,5	4	128					8	ND	0,03			FOX, ERY , FUS		ND	ND	ND
FMV-127	>3	≥23 + ~10 + <3 + <3	-	64	1,5	2	128					16	ND	< 0,008			FUS	ND	ND	ND	ND
FMV-128	>3	≥23+~10 + ~10 + <3	-	0,5	0,25	0,5	16			ND	ND	8	ND	< 0,008			FOX, CIP, NOR, CHL, TET , FUS	ND		ND	ND
FMV-129	2	≥23 + ~10	-	32	> 1,5	2	128					16	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , CIP, NOR, GEN, TOB, TET , FUS				
FMV-130	3	≥23 + ~10 + <3	-	0,5	0,25	0,5	16			ND	ND	16	ND	0,015			FOX, ERY , CLI , CIP, NOR, MXF		ND		
FMV-131	3	≥23 + <3 + <3	-	64	> 1,5	4	128					16	ND	< 0,008			FOX, TOB, SXT, W	ND	ND	ND	ND
FMV-132	1	≥23	-	32	1,5	2	64					16	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , CIP, NOR, MXF, GEN, TOB, TET , FUS				
FMV-133	3	≥23 + ~10 + <3	-	64	> 1,5	4	128					>32	ND	< 0,008			FOX, CLI , TOB		ND		
FMV-134	3	≥23 + ~10 + <3	-	2	0,25	0,5	16			ND	ND	16	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLI , FUS		ND		
FMV-135	1	≥23	32,97	64	1	2	64					8	ND	< 0,008			FOX, ERY , CLi , CIP, NOR, GEN, TOB, TET , FUS				
FMV-136	2	≥23 + ~10	-	0,5	0,25	0,5	16			ND	ND	16	ND	< 0,008			---	ND	ND	ND	ND
FMV-137	1	<3	1,55	32	1,5	4	32					32	ND	0,015			FOX	ND	ND	ND	ND

Negativo

Positivo

CMI:Concentração mínima inibitória; CW: Ensaio de Cartwheel; -: Tamanho não determinado --: Susceptível; ND: Não determinado; EtBr: brometo de etídio; BAC: cloreto de benzalcônio; PT: pentamidina; Ars: arsenato; Cd: cádmio; FOX: cefoxitina ERY: eritromicina; CLI: clindamicina; CLi: Resistência indutível à clindamicina; CIP: ciprofloxacina; NOR: norfloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; TET: tetraciclina; FUS: ácido fusídico; MXF: moxifloxacina; W: trimetoprim; CHL: cloranfenicol; SXT: trimetoprim-sulfametoxazol; 1- Resultados obtidos em estudos anteriores ([120]; Costa *et al* dados ainda não publicados); **Negrito (ex. TET, ERY)**- Antibióticos estudados no presente trabalho.

ANEXO II

Alinhamento do fragmento interno do gene *cadA* e região de corte da enzima *XbaI*.

Primer Fw

```

S.a SAP099A (P) gctgctataacaggagaatctgtccctgttgccaaaacggtagatgatgaagtatttgca ← 852
S.e.SAP0019 (P) gcagctataacaggagaatctgtccctgttcctcaaaacggtagatgacgaagtatttgca ← 852
S.e.BPH0662 (C) gctgctataacaggagaatctgtccctgttgccaaaacggtagatgatgaagtatttgca ← 1080
** *****

S.a SAP099A (P) ggtagccttaacgaagaggggactacttgaagtaaaaatcacaaatacgtagaggatata
S.e.SAP0019 (P) ggtagccttaacgaagaggggactaattgaagtaaaaatcacaaatacgtagaagatata
S.e.BPH0662 (C) ggtagccttaacgaagaggggactacttgaagtaaaaatcacaaatacgtagaggatata
** *****

S.a SAP099A (P) actatctccaagattattcatctgtgtgaggaagcacaaaggggagcgcgctccagcgcaa
S.e.SAP0019 (P) accattgccaagattattcatctgtgtgaggaagcacaaaggggagcgcgctccagcgcaa
S.e.BPH0662 (C) actatctccaagattattcatctgtgtgaggaagcacaaaggggagcgcgctccagcgcaa
** *****

S.a SAP099A (P) gcattcgtagataaatttgcgaaatattatacgccgatcattatggttattgcggcgctc
S.e.SAP0019 (P) gcattcgttagataaatttgcgaaatactacactccgatcattatggttattgcagccttc
S.e.BPH0662 (C) gcattcgttagataaatttgcgaaatattatacgccgatcattatggttattgcggcgctc
*****

S.a SAP099A (P) gttgcagtcgttcaccccttattcttgggtggaagttgggatacttgggtttatcaagga
S.e.SAP0019 (P) gttgcagtcgttcaccccttattcttgggtggaagttgggatacttgggtttatcaagga
S.e.BPH0662 (C) gttgcagtcgttcaccccttattcttgggtggaagttgggatacttgggtttatcaagga
*****

S.a SAP099A (P) ttagcggtagctttagtggatgtccgtgtgcattagttatttctactccaatctcgatt
S.e.SAP0019 (P) ttagcagttctttagtggatgtccgtgtgcattagttatttctactccaatctcgatt
S.e.BPH0662 (C) ttagcggtagctttagtggatgtccgtgtgcattagttatttctactccaatctcgatt
*****

S.a SAP099A (P) gtctcggcaattggaaatgcagctaaaaaagggtgtgttgattaaaggcggtgtctatc
S.e.SAP0019 (P) gtctcggcaattggaaatgcagcgaaaaaagggtgtgttgattaaaggcggtgtctatc
S.e.BPH0662 (C) gtctcggcaattggaaatgcagctaaaaaagggtgtgttgattaaaggcggtgtctatc
*****

S.a SAP099A (P) gaggaattaggagccattaaggcaatcgcatcttgataaaacaggaacactgacaaaaggt
S.e.SAP0019 (P) gaggaattaggagacattaagacagtcgcatcttgataaaacaggaacactgacaaaaggt
S.e.BPH0662 (C) gaggaattaggagccattaaggcaatcgcatcttgataaaacaggaacactgacaaaaggt
** *****

S.a SAP099A (P) gtaccagtggtaacagattttgaagtattaaatgaccaagtgggaagaaaaagagctattc
S.e.SAP0019 (P) gtaccagtggtaacagattttgaagtattaaatgaccaagtgggaagaaaaagagctattc
S.e.BPH0662 (C) gtaccagtggtaacagattttgaagtgttaaatgatcaagtgggaagaaaaagagctgttt
*****

Primer Rv
S.a SAP099A (P) tctatcattacagctttagaatatcgttcacacatccacttgcttcagcaataatgaaa ← 1452
S.e.SAP0019 (P) tctaccattacagctttagaatatcgttcacacatccacttgcttcagcaataatgaaa ← 1452
S.e.BPH0662 (C) tccattattacagctttagaatatcgatcacacatccacttgcttcagcaataatgaag ← 1620
** *****

```

Figura A1. Alinhamento do fragmento interno do gene *cadA*, indicando as zonas de emparelhamento com os primers utilizados neste trabalho e região de corte da enzima *XbaI*.

Sequência do “Primer FW”- Fw_CCAAAGCGGTAGATGACGAA;

Sequência do “Primer RV”- Rv_GCAAGTGGATGTTGTGAACG.